

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ RUTINU V PLODECH BEZU ČERNÉHO

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA KAŇOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## STANOVENÍ RUTINU V PLODECH BEZU ČERNÉHO

ASSESSMENT OF RUTIN IN ELDERBERRIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA KAŇOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0743/2012</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Kateřina Kaňová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Eva Vítová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Jitka Cetková	

### Název diplomové práce:

Stanovení rutinu v plodech bezu černého

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled o:
  - složení a vlastnostech bezu černého
  - rutinu, jeho vlastnostech, účincích, možnostech stanovení
2. Optimalizujte podmínky stanovení rutinu metodou HPLC
3. Aplikujte ji na vybrané vzorky bezu černého
4. Zhodnoťte kvalitu a použitelnost metody, srovnajte obsah rutinu v různých vzorcích bezu

### Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Kateřina Kaňová  
Student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na stanovení koncentrace rutinu v plodech bezu černého (*Sambucus nigra* L.). Teoretická část podává přehled o vlastnostech, výskytu a využití černého bezu v lidovém léčitelství, medicíně a potravinářství. Dále jsou zde uvedeny nejdůležitější obsahové látky černého bezu, zejména flavonoidy, mezi které patří i rutin. Stručně jsou zde popsány jeho vlastnosti, biologické účinky a možnosti stanovení.

V experimentální části je provedena optimalizace a validace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která je použita k identifikaci a kvantifikaci rutinu v 18 odrůdách plodů bezu černého. K přípravě vzorků byla použita metoda extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE) a přečištění pomocí extrakce na pevné fázi (SPE).

Největší množství rutinu bylo zjištěno v odrůdě černého bezu Albida, a to  $6,70 \pm 0,03$  mg v 1 g sušiny. Vysoké koncentrace rutinu obsahovaly také odrůdy Haschberg, Sambu, Pregarten, Sambo a Sampo. Naopak nejnižší koncentrace byla naměřena v plodech odrůdy Aurea,  $1,24 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup>. Obsah rutinu v bezových plodech byl porovnán s obsahem rutinu v bezových listech a větvičkách a významných zdrojích rutinu – pohance a routě.

## ABSTRACT

This work is focused on determination of the concentration of rutin in the fruits of elderberry (*Sambucus nigra* L.). The theoretical part provides an overview of the properties, occurrence and use of elderberry in natural healing, medicine and food industry. Furthermore, important substances contained in elderberry, especially flavonoids, including rutin, are mentioned. Properties, biological effects and the possibility of determination of rutin are briefly described.

In the experimental part the optimization and validation of the method of high performance liquid chromatography (HPLC), which is used for identification and quantification of rutin in fruits of 18 elderberry species, was performed. The pressurized hot water extraction was used for the preparation and solid phase extraction (SPE) for purification of the sample.

The largest amount of rutin was found in a variety of elderberry Albida,  $6,70 \pm 0,03$  mg per 1 g of dry matter. High concentrations of rutin included varieties Haschberg, Sambu, Pregarten, Sambo and Sampo. On the other hand, the lowest concentration was found in variety Aurea,  $1,24 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup>. Finally, rutin content in elderberries was compared with the content of rutin in elder leaves and branches and with significant sources of rutin – buckwheat and rue.

## KLÍČOVÁ SLOVA

rutin, bez černý, HPLC

## KEYWORDS

rutin, elderberry, HPLC

KAŇOVÁ, K. *Stanovení rutinu v plodech bezu černého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 49 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

..

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří zejména Ing. Evě Vítové, Ph.D., RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. a Ing. Jitce Cetkovské za všestrannou pomoc při zpracování této diplomové práce a Akademii věd České republiky za možnost využití jejich přístrojů a pomoc při přípravě vzorků.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
2.1	Bez černý ( <i>Sambucus nigra</i> L.) .....	8
2.1.1	Botanický popis, charakteristika a výskyt .....	8
2.1.2	Lidové léčitelství a medicína .....	8
2.1.3	Využití bezu černého jako potravin .....	9
2.1.4	Další využití .....	9
2.2	Přehled chemických látek obsažených v bezu černém .....	9
2.2.1	Vitaminy a minerální látky .....	10
2.2.2	Sacharidy .....	10
2.2.3	Organické kyseliny .....	10
2.2.4	Senzoricky aktivní látky .....	10
2.2.5	Kyanogenní glykosidy .....	11
2.2.6	Flavonoidy .....	11
2.2.6.1	Struktura .....	12
2.2.6.2	Antokyany .....	13
2.2.6.3	Další flavonoidy .....	13
2.3	Kvercetin-3-rutinosid (rutin) .....	13
2.3.1	Kvercetin .....	13
2.3.2	Rutin .....	14
2.3.2.1	Vlastnosti a výskyt rutinu .....	14
2.3.2.2	Biologické účinky .....	14
2.3.2.3	Možnosti stanovení rutinu v bezu černém .....	15
2.3.2.4	Rutin v routě a pohance .....	15
2.4	Extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE – pressurized hot water extraction) .....	16
2.4.1	Základní princip PHWE .....	16
2.5	Extrakce na pevné fázi (SPE – solid phase extraction) .....	17
2.6	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	17
2.6.1	Stacionární fáze .....	18
2.6.2	Mobilní fáze .....	18
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>19</b>
3.1	Pracovní pomůcky a přístroje .....	19
3.2	Použité chemikálie .....	19
3.3	Příprava standardů a podmínek pro optimalizaci separačního systému .....	19
3.3.1	Příprava kalibračních roztoků pro optimalizaci separační metody .....	19
3.3.2	Kolona a mobilní fáze .....	20
3.3.3	Rozpustnost standardu .....	20

3.4	Vzorky k analýze.....	20
3.5	Úprava rostlinné matrice .....	21
3.6	Podmínky PHWE extrakce.....	21
3.7	Podmínky SPE extrakce .....	22
3.8	Podmínky HPLC analýzy .....	22
3.9	Validační parametry metody .....	23
3.9.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	23
3.9.2	Opakovatelnost.....	24
3.9.3	Linearita .....	24
3.10	Identifikace a kvantifikace rutinu ve vzorcích .....	24
3.10.1	Kalibrační křivka rutinu .....	24
3.10.2	Identifikace rutinu a kvercetinu ve vzorcích .....	24
3.10.3	Kvantifikace rutinu ve vzorcích .....	24
3.10.4	Přepočet koncentrace rutinu na gram reálného vzorku .....	25
3.11	Statistické zpracování výsledků .....	25
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>26</b>
4.1	Optimalizace separačního systému HPLC .....	26
4.1.1	Výběr vhodné kolony a průtoku .....	26
4.1.2	Rozpustnost standardu.....	26
4.2	Validační parametry metody .....	27
4.2.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	27
4.2.2	Opakovatelnost.....	28
4.2.3	Linearita .....	28
4.3	Identifikace a kvantifikace rutinu ve vzorcích .....	28
4.3.1	Kalibrační křivka rutinu .....	28
4.3.2	Identifikace rutinu a kvercetinu ve vybraných vzorcích plodů bezu černého.....	29
4.3.3	Kvantifikace rutinu ve vzorcích plodů bezu černého .....	30
4.4	Srovnání obsahu rutinu v analyzovaných odrůdách bezu černého.....	30
4.5	Srovnání obsahu rutinu v plodech, větvičkách a listech bezu černého .....	32
4.6	Srovnání obsahu rutinu v plodech bezu černého s významnými zdroji rutinu .....	34
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>45</b>

# 1 ÚVOD

Černý bez, patřící do čeledi zimolezovitě, je rozložitý opadavý keř hojně rostoucí zejména na severní polokouli. Jeho léčivé účinky a mnohostranné použití byly popsány již v dávných dobách ve spisech starověkých lékařů. V lidovém léčitelství má svoje místo dodnes. Využívá se také v potravinářství, medicíně a farmacii.

Plody bezu černého zvané též bezinky jsou zajímavé především díky svým obsahovým látkám. Jsou bohatým zdrojem vitamínů, minerálních látek, sacharidů, organických kyselin a hlavně flavonoidů. Mezi flavonoidy patří celá řada biologicky aktivních látek. V plodech bezu černého jsou hojně zastoupena rostlinná barviva antokyany, která jsou zajímavá svými antioxidačními účinky. Dále zde najdeme flavonoly, mezi něž patří také kvercetin a jeho glykosidy, tedy i kvercetin-3- $\beta$ -rutinosid (rutin).

Rutin patří mezi nejvýznamnější flavonoidní sloučeniny. Jeho strukturu tvoří aglykon kvercetin a glykosidicky vázaný disacharid rutinosa, složený z glukosy a rhamnosy. Vykazuje silné antioxidační vlastnosti. Rutin nachází využití při léčbě a prevenci kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a diabetu. Pozitivně působí při zánětlivých onemocněních kloubů, zmenšuje otoky, působí proti vysokému krevnímu tlaku i při léčbě hemeroidů. Je součástí mnoha farmaceutických preparátů a potravních doplňků.

Cílem této diplomové práce je zpracování literárního přehledu o složení a vlastnostech bezu černého a o rutinu, jeho vlastnostech, účincích a možnostech stanovení. Izolaci rutinu z rostlinné matrice lze provést různými technikami. Nejčastěji se využívá různých typů extrakcí. Velmi účinné a často využívané jsou extrakce stlačenými rozpouštědly, například metanolem nebo horkou vodou. K samotné separaci se využívá nejčastěji RP-HPLC s různými typy detektorů (UV-VIS, DAD, MS). Ke stanovení rutinu lze použít také kapilární zónovou elektroforézu. Experimentální část je založena na optimalizaci podmínek pro stanovení rutinu pomocí metody HPLC a aplikaci této metody na vybrané vzorky bezových plodů. V další části je zhodnocena kvalita a použitelnost metody a srovnán obsah rutinu v různých odrůdách bezu černého.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

#### 2.1.1 Botanický popis, charakteristika a výskyt

Černý bez je 3 až 10 m vysoký rozložitý opadavý keř nebo strom. Patří do čeledi zimolezovité (*Caprifoliaceae*).

Má šedohnědou hluboce rozpraskanou kůru se spoustou průdchů. Letorosty jsou dužnaté a sytě zelené, uvnitř mladých větví se nachází čistě bílá houbovitá dřev. Rostlina má vstřícně uspořádané lichozpeřené listy s 3 až 9 pilovitými lístky.

Rozkvétá na počátku léta (*Obrázek 1*). Drobné bílé květy tvoří bohatá vrcholičnatá květenství, vyznačují se velmi silnou až nepříjemnou květinovou vůní. Květy jsou pětičetné a obojpohlavné, obsahují 5 tyčinek se žlutými prašníky, dvou až třípouzdrý podkvětní semeník a trojdílnou bliznu.

Plody (bezinky) dozrávající koncem léta jsou tmavě purpurové až černé peckovice o velikosti 3 až 5 mm. Obsahují 3 až 5 drobných semen. Mají nenápadnou vůni a mírně nakyslou chuť, která je způsobena obsahem organických kyselin.

Vyskytuje se zejména na severní polokouli – v Evropě, Asii, Severní Americe a severní Africe. Je nejrozšířenějším a nejvyužívanějším zástupcem rodu *Sambucus* na našem území. Vybírá si slunná stanoviště a vlhčí půdy kolem cest, potoků a na okrajích lesů. Bývá součástí živých plotů, zahrad a parků.

Je známo velké množství vyšlechtěných odrůd bezu černého. Některé kultivary jsou pěstovány k okrasným účelům, jiné pro množství velkých šťavnatých plodů. Nejběžnějším kultivarem pěstovaným v Evropě je odrůda Haschberg [1–7].



*Obrázek 1: Bez černý - kvetoucí [7]*

#### 2.1.2 Lidové léčitelství a medicína

Černý bez má v lidovém léčitelství dlouholetou tradici. Květy, plody, listy, kůra i kořeny bývají užívány na různorodá onemocnění.

V moderní medicíně jsou nejvyužívanější částí rostliny květy. Destilát z květů má mírně astringentní a povzbuzující účinky a je využíván jako nosič pro oční a pleťovou kosmetiku. Sušené květy mají diaforetické a diuretické účinky a usnadňují vykašlávání. Čaj je využíván při léčbě dýchacích obtíží, při očních zánětech, kašli, horečkách a spále. Vyrábí se z nich mast užívaná na omrzliny, popáleniny, opařeniny a různá další zranění a jizvy po nich.

Plody – bezinky mají močopudné, slabě diaforetické a mírně projímavé účinky. Čaj ze sušených plodů je účinný při průjemových onemocněních a břišních kolikách.

Listy působí projímavě, diaforeticky, diureticky, usnadňují vykašlávání a potlačují krvácení. Mast připravená z bezových listů má zvláčňující schopnosti a je využívána podobně jako mast z květů na pohmožděniny, výrony, omrzliny a jizvy.

Vnitřní část kůry má diuretické, projímavé vlastnosti, využívá se jako emetikum. Používá se při léčbě zácpy a artritických onemocnění. Ze zelené kůry se připravuje zvláčňující mast. Z čerstvé kůry mladých větví se připravují některá homeopatika zmírňující projevy astmatu.

Dužina mladých větví se využívá při léčbě popálenin a opařenin.

Kořen má projímavé a emetické účinky [7].

### **2.1.3 Využití bezu černého jako potraviny**

Zralé tmavě purpurové plody mohou být konzumovány i čerstvé, ale jejich chuť není příjemná. Vynikající chuť mají naopak výrobky z nich připravené, například koláče, omáčky, džemy, želé, zavařeniny, džusy nebo také bezové víno. V Maďarsku se z těchto plodů připravuje dokonce bezová brandy. Plody dodávají potravinářským výrobkům nejen chuť, ale také atraktivní barvu. Díky velkému obsahu antokyanů se bez využívá ke konzervaci džemů a omáček. Zejména do koláčů a zavařenin se kombinuje s dalším ovocem. Skvěle ladí například s ostružinami a jablky. Ve Skandinávii a Německu se z bezových plodů připravuje tradiční polévka. Pro pozdější použití se bezové plody často také suší.

Květy bezu černého se konzumují buď čerstvé, nebo různě upravené. Pro pozdější využití se také mohou sušit. Mají výrazné aroma, často se z nich připravují čaje, čajové směsi a různé osvěžující nápoje zejména v severní Evropě a v Balkánských zemích. Velmi často se z květů připravuje sirup, který se před konzumací dále ředí. Popularita tohoto sirupu vedla v poslední době ke komerční výrobě nápojů s bezovou příchutí. Z bezových květů se připravuje také víno a nejrůznější likéry. Lze je také přidávat do džemů a zavařenin jako ochucovadlo. Celá květenství mohou být obalena v těstíčku a lze z nich udělat bezové smaženky, podobně jako z jiného ovoce [7, 8].

### **2.1.4 Další využití**

Extrakt z bezu černého je v zahradnictví využíván k odpuzování hmyzu, výhonky se zapichují do země k plašení myší a krtků. Černý bez se vysazuje také k ochraně půdy před erozí. Dřevo není vhodné jako stavební materiál, ale využívá se na výrobu menších dřevěných předmětů, například kolíčků na prádlo a různých háčků, především kvůli světlé barvě a vynikajícím možnostem opracování, zejména řezání a leštění [7].

## **2.2 Přehled chemických látek obsažených v bezu černém**

Z mnoha epidemiologických studií vyplývá, že strava bohatá na rostlinné složky, zejména ovoce a zeleninu, snižuje rizika srdečních potíží, rakoviny a dalších chronických onemocnění. Hlavním přínosem takovéto stravy je zvýšený příjem antioxidantů, zahrnujících karotenoidy, soli kyseliny askorbové, tokoferoly a červené, modré a fialové pigmenty známé jako antokyany. Z dietetického hlediska má velký význam různé bobulovité ovoce, jako například

borůvky, ostružiny, černý rybíz, řešetlák nebo dřín. V posledních letech se pozornost obrací také k bezu černému. Šťáva lisovaná z bezových plodů obsahuje celé spektrum bioaktivních látek, flavonoidy, vitaminy, proteiny, cukry, organické kyseliny a další [8].

Velice zajímavým údajem je antioxidační kapacita bezové šťávy. Rupasinghe a kol. [9] ve své studii srovnávají antioxidační kapacitu vín z různých druhů ovoce (hroznové víno několika odrůd, borůvky, černý bez, černý rybíz, třešně, maliny, brusinky, švestky, jablka, broskve, hrušky). Bezové víno mělo druhou nejvyšší antioxidační kapacitu ze všech zkoumaných vzorků, více než čtyřikrát vyšší než u jablečného vína. Mezi vzorky s nejvyšší antioxidační kapacitou patřily vzorky připravené z ovoce s vysokým obsahem antokyanů – červené hrozny, černý bez, borůvky, černý rybíz a také třešně a maliny [9].

Obsahové látky jsou důležité také z hlediska výroby bezových produktů. Například koncentrace antokyanů, rozpustných složek a titrovatelných kyselin významně ovlivňuje barvu a chuť bezových šťáv, džusů a džemů. Velkým problémem může být zákal při výrobě džusů, který bývá spojován s vysokou koncentrací polyfenolických látek a proteinů [10].

Bezové koncentráty lze využít také jako přírodní barvivo do ovocných šťáv a džusů. Například spojením citronové šťávy a bezového koncentrátu vznikne produkt velmi bohatý na bioaktivní sloučeniny. Bezová šťáva zde přináší benefit v podobě vysokého obsahu polyfenolických látek, antokyanů, flavonolů, hydroxycinnamové kyseliny a vitamínu C [11].

### **2.2.1 Vitaminy a minerální látky**

Plody černého bezu jsou vynikajícím zdrojem vitaminů C, B6 a provitaminu A. Z minerálních látek jsou v bezu zastoupeny zejména vápník, draslík, hořčík, fosfor a železo [9, 12].

Různé odrůdy černého bezu se obsahem vitaminů i dalších látek liší. Při srovnání 13 odrůd z hlediska obsahu vitamínu C byl nejvyšší obsah zjištěn u odrůdy Mammut a to 25 mg ve 100 g čerstvých plodů. Vysoká množství obsahovaly také odrůdy Samocco (21 mg/100 g), Samdal a Sampo (18 mg/100 g) [13].

### **2.2.2 Sacharidy**

Celkový obsah sacharidů se pohybuje okolo 104,2 g.kg<sup>-1</sup> čerstvého ovoce. Pro srovnání, jablka obsahují zhruba 115 – 183 g.kg<sup>-1</sup>. Obsah sacharidů ale není z technologického hlediska podstatný, protože cukr lze jednoduše přidat během zpracování. Nejrozšířenější cukry v plodech bezu černého jsou glukosa a fruktosa, v menším množství obsahují také sacharosu [2].

### **2.2.3 Organické kyseliny**

Černý bez je v porovnání s jablkem na organické kyseliny velice bohatý. Nejvíce zastoupenými kyselinami jsou kyselina citronová, jablečná, šikimová a fumarová. Obsah organických kyselin je na rozdíl od obsahu sacharidů velmi významný, protože organické kyseliny se během zpracování už nepřidávají [2].

### **2.2.4 Senzoricky aktivní látky**

Senzoricky aktivní látky jsou látky určující senzorickou jakost potravin. Jde o látky, které člověk vnímá svými smysly, tedy čichem, chutí, zrakem a méně často také hmatem. Tyto látky vyvolávají olfaktorické, gustativní, vizuální a haptické vjemy. K nejvýznamnějším senzoricky aktivním látkám patří látky vonné, látky chuťové, barviva a látky určující texturu potravin. Výsledný vjem vůně, chuti a barvy potravin je obvykle určen složitou směsí desítek

i více sloučenin. Flavour je jednou z nejvýznamnějších charakteristik každé potravy [1, 14, 15].

Chuť bezových plodů je spojována s obsahem cukrů a kyselin a jejich vůně s obsahem těkavých sloučenin. Souvislost mezi obsahem těkavých sloučenin a senzorickou charakteristikou byla mnoha autory studována zejména pomocí plynové chromatografie s olfaktometrickým, plamenově ionizačním nebo hmotnostním detektorem. K izolaci aromatických sloučenin ze vzorku se využívá např. parní destilace, superkritické extrakce nebo mikroextrakce tuhou fází [1, 6, 16, 17].

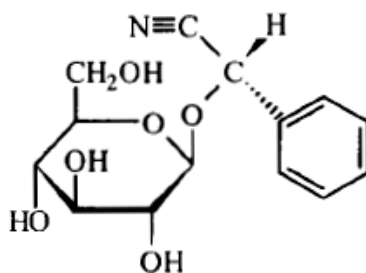
V květech a plodech různých odrůd bezu černého bylo různými autory v různých studiích identifikováno přes 100 různých těkavých sloučenin. Charakteristická vůně bezových květů je spojována zejména s obsahem cis-rose oxidu, nerol oxidu, hotrienolu a linaloolu. Ovocná vůně je dána obsahem pentanolu, heptanalů a  $\beta$ -damascenonu. Svěží vůně spojená s vůní čerstvé trávy je primárně asociována s přítomností hexanalů, hexanolů a (Z)-3-hexenolu [5, 7, 16].

### 2.2.5 Kyanogenní glykosidy

Kyanogeneze je schopnost rostlin produkovat rozkladem kyanogenních sloučenin kyanovodík. Kyanogenní sloučeniny byly prokázány v různých částech zhruba 3 000 druhů rostlin. Předpokládá se, že v rostlinách hořkou chutí a pachem vzniklých rozkladných produktů odpuzují predátory a účastní se metabolismu dusíku. Jsou totiž zásobní formou dusíku při klíčení a počátečních fázích vývoje rostlin.

Kyanogenní glykosidy jsou nejdůležitějšími a nejrozšířenějšími kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo jako krmiva hospodářských zvířat. Jde o glykosidy 2-hydroxynitrilů a nejčastěji vázaným cukrem je v nich  $\beta$ -D-glukosa.

Sambunigrin (Obrázek 2) je hlavním kyanogenním glykosidem černého bezu. Je obsažen ve všech vegetativních orgánech a nezralých plodech. Při dozrávání jeho obsah klesá a v době zralosti se již v plodech nevyskytuje. Šťáva vyrobená z nezralých plodů bezu černého neobsahuje koncentrace sambunigrinu z hlediska zdravotního riziková, může být však senzoricky nepříjemná pro hořkost způsobenou tímto kyanogenem. Tepelnou úpravou se sambunigrin rozkládá. Příznaky mírné otravy jsou bolesti hlavy, pocit úzkosti v hrdle a na hrudi, zvracení, bušení srdce, zrychlení srdečního rytmu, svalová bolest a dušnost [8, 14].



Obrázek 2: Sambunigrin [14]

### 2.2.6 Flavonoidy

Flavonoidy, také nazývané bioflavonoidy, jsou polyfenolické antioxidanty přirozeně se vyskytující v rostlinách. Jedná se o sekundární metabolity, tedy organické sloučeniny, které nejsou přímo zapojeny do růstu a vývoje rostliny. V rostlinné říši jsou široce rozšířené, jsou zodpovědné například za široké spektrum barev květů a plodů. Hrají důležitou roli také v ochraně rostlin před různými škůdci. Konzumace potravy obsahující flavonoidy je velkým

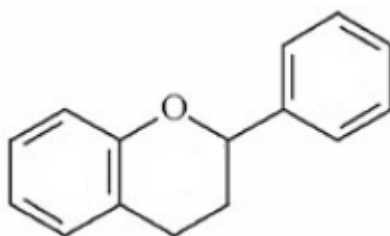
přínosem pro lidské zdraví. Nejnovější výzkumy dokazují, že pomáhají prostřednictvím různých enzymů redukovat rizika některých druhů rakoviny, mozkové mrtvice, srdečních potíží a degenerativních onemocnění spojených se stářím. Jiné výzkumy poukazují na příznivý vliv v prevenci zubního kazu a výskytu běžných onemocnění jako například chřipky.

Působí několika různými mechanismy. Mohou změnou enzymové aktivity snižovat karcinogenitu xenobiotik nebo svými antioxidačními vlastnostmi snižovat oxidační stress, jeden z faktorů vzniku rakoviny. Některé flavonoidy mohou v gastrointestinálním traktu interagovat s karcinogeny a tím snižovat možnost jejich absorpce [10, 12, 18–21,].

Mezi potraviny s vysokým obsahem flavonoidů patří borůvky, černý bez, červené fazole, brusinky, ostružiny, čaj a červené víno. Vyskytují se však ve všech druzích ovoce a zeleniny i skořápkových plodech [18, 22].

### 2.2.6.1 Struktura

Flavonoidní látky tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných fenolů. V současné době je známo přes 4 000 různých flavonoidních látek. V molekule obsahují 2 benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. U většiny flavonoidů je  $C_3$  řetězec součástí pyranového kruhu, čímž vzniká struktura zvaná 2H-chromen. Základní struktura flavonoidů je odvozena od 2H-chromenu substituovaného v poloze  $C_2$  fenylovou skupinou a nazývá se flavan (Obrázek 3). Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Vyskytují se volně jako aglykony nebo častěji jako glykosidy. Cukernou složku v nich nejčastěji tvoří D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, L-arabinosa, D-xylosa, D-apiosa nebo D-glukuronová kyselina [14, 20].



Obrázek 3: Flavan [19]

Podle stupně oxidace  $C_3$  řetězce se rozeznávají základní struktury flavonoidů:

- katechiny
- leukoantokyanidiny
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- antokyanidiny

Se stupněm oxidace roste také intenzita zabarvení.

Ze strukturně příbuzných sloučenin, většinou produktů biosyntézy a katabolismu flavonoidů, u kterých jsou benzenové kruhy spojeny alifatickým  $C_3$  řetězcem, do této skupiny patří chalkony, dihydrochalkony a aurony.

Substituenty 2*H*-chromenu, které mají fenylovou skupinu v poloze C<sub>3</sub> se nazývají isoflavonoidy a ty které mají toto spojení v poloze C<sub>4</sub>, se nazývají neoflavonoidy [14].

### 2.2.6.2 Antokyany

Antokyany, také nazývané antokyaniny, jsou nejrozšířenější a početně velmi rozsáhlou skupinou přírodních barviv. V přírodě bylo dosud identifikováno kolem 300 různých antokyanů. Tato ve vodě rozpustná barviva jsou zodpovědná za atraktivní oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvu mnoha druhů ovoce, zeleniny a květin.

Antokyany izolované z přírodních zdrojů se využívají jako barviva v potravinářství a farmacii. Nevýhodou je, že intenzivní barvu mají pouze v prostředí o pH < 3,5, takže jsou vhodné jen pro kyselé potraviny. Nejčastěji se k barvení potravin využívá antokyanových barviv ze slupek hroznů révy vinné, plodů bezu černého, plodů arónie černoplodé a hlávek červeného zelí [14, 23].

Stejně jako ostatní flavonoidy prokazatelně působí antioxidačně, antikarcinogenně, imunostimulačně, antibakteriálně, antialergicky, a antivirově a jejich konzumace je dobrou prevencí mnoha onemocnění [2, 20].

Černý bez a zejména šťáva z plodů – bezinek je bohatým zdrojem antokyanů a dalších fenolických sloučenin. Z antokyanů jsou zde v nejvyšších koncentracích zastoupeny kyanidin-3-sambubiosid, 3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-rutinosid [2, 3, 14].

### 2.2.6.3 Další flavonoidy

Dalšími flavonoidy jsou většinou světle žlutá až tmavě žlutá barviva flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, chalkony, aurony a isoflavony. Jako pigmenty potravin mají největší význam flavony a flavonoly.

Většina flavonoidů se v potravinách účastní reakcí enzymového hnědnutí. Schopnost vázat těžké kovy spolu se schopností terminovat radikálové oxidační reakce dává flavonoidům vlastnosti antioxidantů.

Flavonoly jsou spolu s flavony nejrozšířenějšími žlutými pigmenty rostlin. Do skupiny flavonolů patří také kvercetin a jeho glykosidy, např. kvercetin-3-β-rutinosid, zvaný též rutin [14].

V černém bezu jsou ze skupiny flavonolů nejhojněji zastoupeny rutin, isokvercitrin a astragalin [24].

## 2.3 Kvercetin-3-rutinosid (rutin)

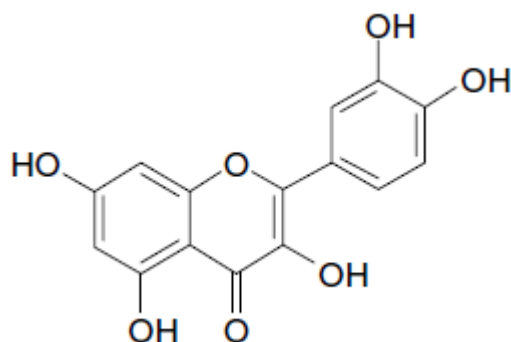
### 2.3.1 Kvercetin

Kvercetin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon (Obrázek 4), poprvé izolovaný z vnitřní kůry dubu *Quercus velutina*, je oranžovohnědý prášek. Je jedním z nejčastěji se vyskytujících flavonoidů v ovoci a zelenině. V rostlinách se vyskytuje zejména v listech a v dalších částech rostliny ve formě aglykonů a glykosidů, v nichž je na fenolické struktuře glykosidickou vazbou navázána jedna nebo několik cukerných molekul. Nejčastěji se zde vyskytuje glukosa, rhamnosa nebo galaktosa [19, 25, 26].

Epidemiologické studie poukazují zejména na jeho pozitivní účinky v prevenci kardiovaskulárních chorob a nádorových onemocnění. Tyto zdraví podporující vlastnosti jsou spojovány s jeho antioxidační aktivitou. Ve velkém množství se vyskytuje v cibuli, jablkách, zeleném a černém čaji [19, 25].

Ve studii Kaacka a Austeda [13], zabývající se mimo jiné stanovením koncentrace kvercetinů v čerstvých šťávách z plodů bezu černého, byly nejvyšší koncentrace zjištěny u odrůd Haschberg (60 mg/100 g čerstvého ovoce), Mammut (57 mg/ 100 g čerstvého ovoce) a Finn Sam (53 mg/100 g čerstvého ovoce).

Ze skupiny kvercetinů byly v černém bezu detekovány kvercetin-3-rutinosid a kvercetin-3-glukosid [2].



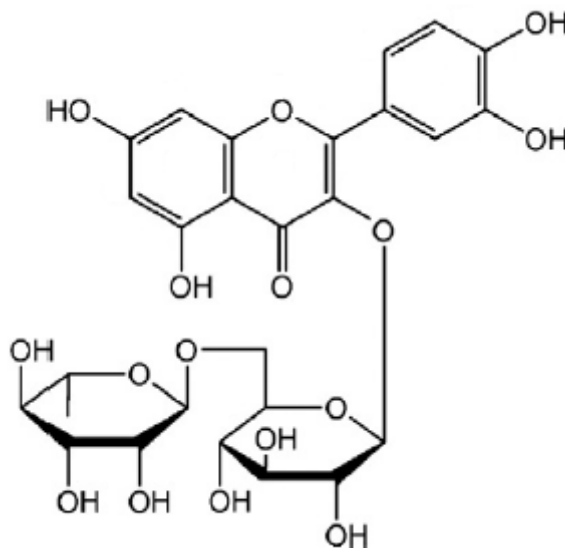
Obrázek 4: Kvercetin [21]

## 2.3.2 Rutin

### 2.3.2.1 Vlastnosti a výskyt rutinu

Rutin (vitamin P) je jednou z nejvýznamnějších flavonoidních sloučenin. Jeho strukturu tvoří aglykon kvercetin a glykosidicky vázaný disacharid rutinosy, složený z glukosy a rhamnosy (Obrázek 5). V čisté formě tvoří světle žluté až žlutozelené ve vodě málo rozpustné krystalky.

Poprvé byl izolován z listů routy vonné (*Ruta graveolens*). Kromě routy se hojně vyskytuje v pohance, cibuli a mnoha dalších druzích ovoce a zeleniny včetně černého bezu [27, 28].



Obrázek 5: Rutin [29]

### 2.3.2.2 Biologické účinky

Rutin je součástí mnoha farmaceutických preparátů a potravních doplňků. Je doporučován při léčbě a prevenci poškození cév, zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic, při cévní nedostatečnosti dolních končetin a při léčbě hemeroidů [26, 27].

Rutin vykazuje silné antioxidační vlastnosti. Redukuje Fentonovu reakci, při níž v těle vznikají nežádoucí kyslíkové radikály. Existuje několik studií dokazujících jeho ochranný vliv proti oxidaci hemoglobinu. Výsledky ukazují, že rutin je potenciálním donorem elektronů, může převést reaktivní molekuly volných radikálů na stabilnější formy a ukončit tak radikálovou řetězovou reakci. Mimo to chrání LDL-lipoproteiny o nízké hustotě před oxidací, čímž preventivně bojuje proti vzniku aterosklerotických plátů a následným kardiovaskulárním potížím [14, 28, 30, 31].

Cukerná část molekuly rutinu ovlivňuje jeho vstřebávání v organismu a působení na kardiovaskulární systém. Modifikuje biosyntézu eikosanoidů, které mají různé biologické funkce – odpověď na zánětlivé procesy, krevní srážení, imunitní reakce. Působí preventivně proti srážení krevních destiček (protitrombotický efekt) a podporuje relaxaci cévního hladkého svalstva, čím působí proti vysokému krevnímu tlaku [30].

Spolu s dalšími flavonoidními látkami zvyšuje hladinu kyseliny askorbové v různých živočišných orgánech tím, že ji buď chrání před oxidací katalyzovanou ionty kovů, nebo zvyšuje její utilizaci v organismu. Přirozené zdroje askorbové kyseliny obsahující flavonoidy (např. šípky, kde je značné množství rutinu) jsou proto účinnější než syntetický vitamin C [14].

Byl zjištěn také pozitivní vliv rutinu při léčbě zánětlivých onemocnění kloubů, např. infekční artritidy. Pomáhá výrazně zmenšit otoky a zkracuje dobu léčby [32].

Další studie poukazují na příznivý vliv rutinu při léčbě diabetu a prevenci degenerativních změn a komplikací spojených s tímto onemocněním – poškození plic, ledvin a močových cest, diabetické neuropatie. Byl zde prokázán jeho pozitivní vliv na metabolismus cukrů i tuků [33–35].

#### **2.3.2.3 Možnosti stanovení rutinu v bezu černém**

Izolaci rutinu z rostlinné matrice (plodů, květů, listů, větviček) lze provést různými metodami. Nejčastěji se využívá různých typů extrakcí. Velmi účinné jsou extrakce stlačenými rozpouštědly (PLE), zejména metanolem, stlačenou horkou vodou nebo směsí etanolu a vody. K extrakci za normálního tlaku byl použit například metanol s přísadkou HCl a BHT. Dále je možné využít Soxhletovu extrakci nebo extrakci disperzní tuhou fází (MSPD).

Samotná separace je prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Využívají se různé typy detektorů, nejčastěji spektrofotometrický (UV-VIS), detektor diodového pole (DAD) nebo hmotnostní detektor (MS). Ve studiích se využívá jak gradientová, tak isokratická eluce. V mobilní fázi se kromě vody nejčastěji vyskytuje metanol, acetonitril, kyselina octová a kyselina mravenčí. Separace většinou probíhá většinou v rozmezí teplot 25 – 35 °C [2, 10, 11, 19, 24, 36–40].

Podrobný přehled podmínek separace pomocí kapalinové chromatografie v různých studiích věnovaných rutinu, kvercetinu a těchto dvou látek ve směsi je uveden v diplomové práci Píšťkové [36].

Další metodou, kterou lze pro stanovení rutinu použít, je kapilární zónová elektroforéza. Lze ji použít buď samostatně [41] nebo ve spojení s izotachoforézou [42].

#### **2.3.2.4 Rutin v routě a pohance**

Routa vonná (*Ruta graveolens*) je léčivá rostlina pěstovaná v mnoha oblastech po celém světě. Z obsahových látek jsou významné chinolinové alkaloidy, kumariny, lignany, terpeny a flavonoidy. Tyto látky mají velmi široké farmaceutické účinky. Routa se využívá například



při léčbě srdečních a cévních onemocnění a křečů. Vykazuje protizánětlivé, protiplísňové, protinádorové a antibakteriální účinky a pozitivně působí při léčbě hypertenze [43, 44].

Routa vonná je velmi bohatá na rutin. Z této rostliny byl také poprvé izolován. Adam a kol. [45] ve své studii mimo jiné srovnávají koncentraci rutinu v několika různých léčivých rostlinách – routa vonná, máta dlouholistá, máta klasnatá, řebříček obecný, jitrocel kopinatý, koriandr setý. Z těchto rostlin měla routa nejvyšší obsah rutinu, a to více než čtyřnásobné množství než máta dlouholistá, která byla v pořadí druhá.

Pohanka je považovaná za nejvýznamnější zdroj rutinu v dietě. Jedná se o jednoletou teplomilnou rostlinu pocházející z Číny. Nejčastějšími druhy jsou *Fagopyrum esculentum* Moench – pohanka setá a *Fagopyrum tartaricum* – pohanka tatarská. Kromě rutinu pohanka obsahuje celou řadu dalších významných látek. Díky obsahu významných proteinů, lipidů, minerálních látek, flavonoidů a rostlinných sterolů bývají některé výrobky z pohanky řazeny mezi funkční potraviny. Nejčastěji se konzumují semena pohanky. Vyšší obsah rutinu se nachází v semenech pohanky tatarské, nicméně nevýhodou je jejich nahořklá chuť. Semena pohanky seté jsou větší a vyznačují se sladší chutí [46–48].

## **2.4 Extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE – pressurized hot water extraction)**

Pro izolaci rutinu ze vzorků bezu černého byla na základě literární rešerše [36, 37] zvolena a v této práci použita extrakce horkou vodou za zvýšeného tlaku a teploty, PHWE. Tato metoda patří do skupiny extrakcí, při nichž se využívá zvýšeného tlaku a teplot nad běžným bodem varu rozpouštědla.

Tradiční extrakce za normálních tlaků a teplot s sebou nese celou řadu nevýhod. Kromě nižší efektivity také velkou spotřebu organických rozpouštědel nešetrných k životnímu prostředí. Proto se v posledních letech velmi rozvíjejí nové metody přípravy vzorku, jako například superkritická fluidní extrakce (SFE), mikrovlnná extrakce (MAE) a extrakce stlačenými tekutinami (PLE), mezi něž můžeme zařadit i PHWE.

Využití vody jako extrakčního rozpouštědla má řadu výhod. Voda je jednoduše dostupná, netoxická, nehořlavá a ekologicky přijatelná. Z tohoto důvodu se stává PHWE levnou a efektivní metodou extrakce méně polárních organických sloučenin z prostředí, půdy a rostlinných materiálů [39, 49, 50–52].

### **2.4.1 Základní princip PHWE**

Voda je vysoce polární rozpouštědlo s vysokou dielektrickou konstantou při pokojové teplotě a atmosférickém tlaku díky přítomnosti vodíkových můstků. Proto bývá při normální teplotě považována za nevhodné rozpouštědlo pro nepolární a organické sloučeniny. Při zvýšení teploty dochází však k poklesu permitivity, viskozity i povrchového napětí, čímž dojde ke zvýšení difúzních charakteristik vody. Výrazně se zlepší schopnosti vody pronikat do matrice. Pracovní tlak při extrakci musí být vyšší než tenze nasycených vodních par za příslušné teploty, aby voda zůstala v kapalném stavu [49, 50].

Základními parametry ovlivňujícími celý proces jsou teplota, extrakční čas a také přídavek organického rozpouštědla nebo povrchově aktivních látek [51].

Podmínkou využití PHWE k extrakci biologických materiálů je dostatečná teplotní stabilita sledovaných látek a jejich odolnost vůči hydrolýze za podmínek extrakce. Katalytická aktivita některých kovů obsažených v konstrukčních materiálech extrakční cely (nerezová ocel, speciální slitiny) může vést k nežádoucím chemickým změnám extrahovaných látek. Kromě

toho je ve všech aplikacích PHWE vždy nezbytné vodu před extrakcí důkladně zbavit rozpuštěného vzdušného kyslíku [49].

Samotný mechanismus extrakce je rozdělen do několika kroků. Nejprve dochází za zvýšeného tlaku a teploty k uvolnění látek z matrice vzorku. V druhém kroku následuje difúze extrakčního rozpouštědla do matrice a v dalším přejdou látky z matrice do extrakčního činidla. V posledním kroku je extrakt odveden z cely a sbírán do vialek [50].

## **2.5 Extrakce na pevné fázi (SPE – solid phase extraction)**

Extrakce tuhou fází se využívá při purifikaci surového extraktu před samotnou analýzou, případně ke zkoncentrování sledovaného analytu. Principem je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. SPE kolonky jsou nejčastěji naplněny sorbenty na bázi modifikovaných částic silikagelu. Podle typu modifikace silanolových skupin se sorbenty rozlišují na polární, nepolární a iontově výměnné. Volba vhodného sorbentu závisí na vlastnostech sledovaného analytu, vyžadovaném stupni čistoty, vlastnostech matrice, kontaminantech vzorku a také na finálním analytickém postupu. Analyty jsou separovány na základě interakcí se sorbentem prostřednictvím van der Waalsových sil, elektrostatických sil nebo vodíkových můstků a roli může hrát také velikost částic [53–55].

V současné době je tato metoda velmi populární. Lze najít četné studie využívající SPE k selektivní přípravě vzorku. Denev a kol. [53] ve své studii, zabývající se antioxidačními vlastnostmi antokyanů izolovaných z bobulovitého ovoce (včetně černého bezu), úspěšně využívají SPE k odstranění nefenolických látek ze vzorků před samotnou analýzou. Michalkiewicz a kol. [56] tuto metodu aplikují při analýze flavonolů (rutin, kvercetin) a fenolických kyselin v medu. Ishii a kol. [57] využívají techniku SPE ve své studii při stanovení koncentrace rutinu a dalších glykosidů kvercetinu v lidské plazmě a moči po 14 denní konzumaci rajčatového pyré. Podobných studií je k dispozici velmi mnoho.

## **2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Chromatografie patří mezi separační techniky. Její základy položil ruský vědec M. S. Cvět již na počátku 20. století. Jako první dokázal pomocí sloupcové chromatografie rozdělit listová barviva a použil termín chromatografie.

Všechny typy chromatografie jsou založeny na kontaktu vzorku se dvěma fázemi, mobilní a stacionární, a jejich vzájemných interakcích. Jednotlivé složky vzorku jsou děleny na základě rozdílné afinity mezi tyto fáze. Komponenty neinteragující se stacionární fází procházejí kolonou nejrychleji. Naopak komponenty, které se stacionární fází interagují, postupují kolonou velmi pomalu. Čas, který analyt v koloně stráví, se nazývá retenční čas [54].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography) je dnes nejčastěji používaným druhem chromatografie. Je to velmi citlivá a selektivní analytická metoda identifikace a kvantifikace látek i ve složitých směsích. Poskytuje velmi kvalitní výsledky za krátký čas. V některých aplikacích může být použita také jako metoda purifikace produktu nebo sloučeniny.

Mobilní fáze je zde kapalná a stacionární pevná, umístěná v koloně z nerez oceli. Mobilní fáze unáší vzorek kolonou a jeho separace je dána jak interakcí se stacionární fází, tak složením mobilní fáze. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla různé polarity. Cílem je vždy rozdělení sledovaných sloučenin, zkrácení retenčních časů a tím co nejkratší doba analýzy [54].

### **2.6.1 Stacionární fáze**

Stacionární fáze může být více či méně polární. Důležitými parametry jsou kromě polarity zejména velikost částic, struktura, porozita, specifický povrch a mechanická odolnost. Z polárních sorbentů se nejčastěji využívá silikagel (oxid křemičitý). Jde o zesíťovaný anorganický polymer s různým počtem silanolových skupin. Z polárních sorbentů se dále využívá alumina (oxid hlinitý) [54, 55].

Z nepolárních sorbentů je nejrozšířenější modifikovaný silikagel. Na silanolové skupiny jsou nejčastěji vázány oktylové (C 8) nebo oktadecylové skupiny (C 18) [54].

### **2.6.2 Mobilní fáze**

Stupeň interakce mezi mobilní a stacionární fází, ať už v chromatografii s normálními nebo obrácenými fázemi, ovlivňuje retenční čas analytů. Pokud je stacionární fáze polární, jedná se o chromatografii s normálními fázemi a používá se méně polární mobilní fáze. Nepolární mobilní fázi zde může tvořit například hexan, toluen nebo dichlormetan.

Naopak pokud je stacionární fáze nepolární nebo jen slabě polární, jde o chromatografii s obrácenými (reverzními) fázemi a mobilní fáze bývá polární, často voda ve směsi s metanolem nebo acetonitrilem [55, 58].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na identifikaci a kvantifikaci rutinu v plodech bezu černého pomocí HPLC. Obsah rutinu byl stanoven v 18 různých odrůdách černého bezu. Jednotlivé vzorky byly před samotnou analýzou HPLC zhomogenizovány, usušeny, extrahovány technikou PHWE a extrakty následně přečištěny pomocí SPE kolonek.

#### 3.1 Pracovní pomůcky a přístroje

- běžné laboratorní pomůcky
- homogenizátor Ultra Turrax T18 basic (IKA, Německo)
- horkovzdušná sušárna UNB 400 (Memmert, Německo)
- analytické váhy (Boeco, Německo)
- celulózové mikrofilmy 0,45  $\mu\text{m}$  (Chromservis, Česká republika)
- SPE kolonky, Oasis HLB 3cc (60 mg) Extraction Cartridge (Waters, Irsko)
- PHWE (vyvinutá na Ústavu analytické chemie Akademie věd Brno, Česká republika)
- HPLC
  - pumpa GT-104 (Schimadzu, Japonsko)
  - degaser FCV-10AL (Schimadzu, Japonsko)
  - DAD detektor SPD-M10AVP (Schimadzu, Japonsko)
  - termostat CTO-10A (Schimadzu, Japonsko)
  - kolony:
    - SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-8DB; 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 4,6 mm (Supelco, USA)
    - XBridge<sup>TM</sup> C18; 3,5  $\mu\text{m}$ ; 150 x 3,0 mm (Waters, USA)
    - SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC18-DB; 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 4,6 mm (Supelco, USA)
  - počítač - software pro HPLC CLASS-LC10

#### 3.2 Použité chemikálie

- kyselina mravenčí, 98 % (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- metanol, HPLC grade (Biosolve, Nizozemsko)
- voda pro HPLC (FCH VUT Brno, Česká republika)
- standardy
  - rutin, minimum 95 %, hydrát (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
  - kvercetin, dihydrát (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

#### 3.3 Příprava standardů a podmínek pro optimalizaci separačního systému

##### 3.3.1 Příprava kalibračních roztoků pro optimalizaci separační metody

Pro optimalizaci separační metody byly připraveny kalibrační roztoky standardů rutinu a kvercetinu. Na analytických vahách bylo naváženo vždy 0,050 0 g příslušného standardu. Navážka byla rozpuštěna v metanolu, převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněna metanolem po rysku. Výsledná koncentrace obou kalibračních roztoků byla tedy 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Z těchto roztoků byly dále připraveny roztoky o koncentraci 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , které byly použity při optimalizaci separačního procesu.

Smícháním 1 ml roztoku rutinu (0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a 1 ml roztoku kvercetinu (0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) byl připraven směsný standard rutinu a kvercetinu.

### 3.3.2 Kolona a mobilní fáze

Při optimalizaci byla zkoušena různá složení mobilní fáze na třech různých kolonách.

Kolona SUPELCOSIL™ LC-8DB byla zkoušena s mobilními fázemi:

- voda : metanol : kyselina mravenčí
  - 61,5 : 36,0 : 2,5
  - 72,5 : 25,0 : 2,5
  - 67,5 : 30,0 : 2,5
  - 63,5 : 34,0 : 2,5

Kolona XBridge™ C18 byla zkoušena s mobilními fázemi:

- voda : metanol : kyselina mravenčí
  - 61,5 : 36,0 : 2,5
  - 63,5 : 35,0 : 1,5
  - 64,0 : 35,0 : 1,0
  - 33,0 : 65,5 : 1,5

Kolona SUPELCOSIL™ LC18-DB byla zkoušena s mobilními fázemi:

- voda : metanol : kyselina mravenčí
  - 61,5 : 36,0 : 2,5

Při změně mobilní fáze je důležité ustálení používané kolony, proto vždy byla kolona promývána přes noc, než byla provedena analýza standardů.

### 3.3.3 Rozpustnost standardu

Byla provedena zkouška rozpustnosti rutinu ve vodě, v metanolu a v mobilní fázi o složení:

- voda : metanol : kyselina mravenčí
  - 61,5 : 36,0 : 2,5

Bylo naváženo třikrát 0,050 0 g rutinu. Toto množství bylo rozpuštěno v uvedených rozpouštědlech, převedeno do tří 100 ml odměrných baněk a doplněno po rysku. Baňky byly na deset minut umístěny do ultrazvukové lázně a poté ponechány přes noc v ledniče. Další den byly podle potřeby zfiltrvány a analyzovány pomocí HPLC s kolonou SUPELCOSIL™ LC18-DB.

### 3.4 Vzorky k analýze

Bylo analyzováno celkem 18 vzorků plodů bezu černého dodaných Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o. Vzorky bezu byly sbírány v září roku 2011, okamžitě zmrazeny a skladovány v mrazničce při – 16 °C až do doby analýzy. Byly dodány tyto šlechtěné odrůdy: Albida, Allesö, Aurea, Bohatka, Dana, Haschberg, Körsör, Heidegg 13, Mammut, Pregarten, Riese aus Voßloch, Sambo, Sambu, Samdal, Sampo, Samyl, Weihenstephan a jeden vzorek planého bezu.

Pro srovnání byly analyzovány ještě dva významné zdroje rutinu:

- Ruta nať (*Herba Rutae*), Valdemar Grešík, NATURA s.r.o.
- Pohanka (loupaná, kroupy), Albert bio, AHOLD ČR a.s.

### 3.5 Úprava rostlinné matrice

Vzorky musely být před extrakcí zhomogenizovány a usušeny. Plody byly vyjmuty z mrazničky, homogenizovány laboratorním homogenizátorem a usušeny na odpařovacích miskách v laboratorní sušárně. Sušení probíhalo 48 h, nejprve při 40 °C a po 24 h byla teplota zvýšena na 50 °C. Usušená směs byla tloučkem rozmělněna v třecí misce a následně extrahována technikou PHWE.

### 3.6 Podmínky PHWE extrakce

Pro získání rutinu ze vzorků byla použita metoda PHWE. Extrakce byla provedena ve třech cyklech po 5 minutách při teplotě 100 °C a tlaku 15 MPa. K extrakci byla využita PHWE aparatura (Obrázek 6) vyvinutá na Ústavu analytické chemie (Akademie věd Brno, Česká republika), kde byly extrakce také provedeny.

Z předem připravených vzorků bylo odváženo množství 1 g (při nedostatku vzorku množství menší – viz *Tabulka 1*). Nerezové patrony byly utěsněny fritou, na ni byl nasypán inertní materiál (skleněné kuličky o velikosti 500–700 µm), dále odvážené množství vzorku a opět inertní materiál v podobě kuliček. Takto připravená patrona byla umístěna do extraktoru.

Získaný vodný extrakt byl ještě týž den převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn extrakčním rozpouštědlem (HPLC vodou) po rysku. Hned poté bylo provedeno ještě přečištění extraktu přes SPE kolonku.



Obrázek. 6: PHWE aparatura [49]

Tabulka 1.: Navážka vzorků na extrakci a objem extraktu pipetovaný na SPE kolonku

vzorek		navážka na extrakci (g)	objem extraktu na SPE (ml)
odrůda černého bezu	Albida	1	2
	Allesö	1	2
	Aurea	1	2
	Bohatka	0,48	4
	Dana	0,67	4
	Haschberg	1	2
	Heidegg 13	1	2
	Körsör	1	2
	Mammut	1	2
	planý bez	1	2
	Pregarten	1	2
	RieseausVoßloch	1	2
	Sambo	1	2
	Sambu	1	2
	Samdal	1	2
	Sampo	1	2
	Samyl	1	2
	Weihenstephan	1	2
	route	1	2
	pohanka	1	2

### 3.7 Podmínky SPE extrakce

Vodný extrakt z odměrné baňky byl ihned přečištěn přes SPE kolonku. Sledovaný analyt byl získán v podobě vysoce čistého extraktu.

SPE kolonka byla aktivována 2 ml metanolu a následně 2 ml HPLC vody, podle pokynů výrobce. Dále byly na kolonku nadávkovány 2 ml extraktu. Analyt (rutin) zachycený na sorbentu byl eluován 2 ml metanolu. U vzorků s navážkou menší než 1 g byly dávkovány 4 ml extraktu a analyt byl eluován 2 ml metanolu (viz *Tabulka 1*), čímž došlo k jeho zkoncentrování.

### 3.8 Podmínky HPLC analýzy

K analýze vzorků byla použita kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC18-DB o rozměrech 250 x 4,6 mm a velikosti částic sorbentu 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu, vody a kyseliny mravenčí v poměru 36,0 : 61,5 : 2,5. Průtok eluentu kolonou byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup> a teplota v koloně na 30 °C. Velikost dávkovací smyčky pro vzorek byla 5 µm. Detekce látek byla provedena pomocí detektoru diodového pole při vlnové délce 360 nm. Celé HPLC zařízení je na *Obrázku 7*.

Analyt převedený pomocí SPE kolony do metanolu byl před nástřikem do dávkovací smyčky přečištěn přes mikrofiltr.



Obrázek 7: Vysokoučinný kapalinový chromatograf

### 3.9 Validační parametry metody

#### 3.9.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro určení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byl sledován šum základní linie po dobu dvacetinásobku pološířky píku sledovaného analytu.

Odezva meze detekce byla určena jako trojnásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu

$$y_D = 3h \quad (1)$$

a koncentrace na mezi detekce

$$x_D = \frac{y_D}{b_1}, \quad (2)$$

kde  $b_1$  je směrnice kalibrační přímky koncentrační závislosti  $y = b_1x$ , kde  $y$  je výška chromatografického píku a ne plocha, jak je obvyklé [59].

Odezva meze stanovitelnosti byla určena jako desetinásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu

$$y_S = 10h_{\max} \quad (3)$$



a mez stanovitelnosti

$$x_s = \frac{y_s}{b_1}, \quad (4)$$

kde  $b_1$  je směrnice kalibrační přímky koncentrační závislosti  $y = b_1 x$ , kde  $y$  je výška chromatografického píku [59].

### 3.9.2 Opakovatelnost

Pro určení opakovatelnosti byly vybrány 3 roztoky standardu o různých koncentracích: 0,01 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> a 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>. U každého roztoku byla 6x provedena analýza ( $n = 6$ ). Opakovatelnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků.

### 3.9.3 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, analytickým signálem a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient ( $R$ ). Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější [59]. Hodnota  $R$  byla odečtena z kalibrační křivky rutinu (v koncentračním rozsahu 0,005–0,5 mg.ml<sup>-1</sup>).

## 3.10 Identifikace a kvantifikace rutinu ve vzorcích

### 3.10.1 Kalibrační křivka rutinu

Pro přípravu kalibrační křivky bylo na analytických vahách naváženo 0,050 0 g rutinu. Navážka byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna metanolem po rysku. Výsledná koncentrace takto připraveného roztoku byla tedy 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>. Z tohoto roztoku byly postupně připraveny další roztoky kalibrační řady. Jejich koncentrace byly 0,25 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,08 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,05 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,02 mg.ml<sup>-1</sup>, 0,01 mg.ml<sup>-1</sup> a 0,005 mg.ml<sup>-1</sup>. Každý z roztoků byl třikrát proměřen. Z průměrných hodnot ploch píků v závislosti na koncentraci byl sestaven graf.

### 3.10.2 Identifikace rutinu a kvercetinu ve vzorcích

Sledované analyty byly identifikovány na základě retenčních časů. Ze vzorků byly náhodně vybrány tři, v nichž byla provedena identifikace rutinu a kvercetinu. Vzorek byl vždy smíchán se standardem v poměru 1 : 1.

- vzorek Samdal + roztok rutinu o koncentraci 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>
- vzorek Weihestephana + roztok rutinu o koncentraci 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>
- vzorek planého bezu + roztok kvercetinu o koncentraci 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>

### 3.10.3 Kvantifikace rutinu ve vzorcích

Vzorky černého bezu, routy a pohanky byly po SPE a mikrofiltraci analyzovány pomocí HPLC. Koncentrace rutinu v reálných vzorcích byla vypočítána z rovnice regrese. Přepočet koncentrace byl proveden podle kapitoly 3.10.4.

### 3.10.4 Přepočet koncentrace rutinu na gram reálného vzorku

Na analýzu HPLC byly odebrány 2 ml extraktu z 50 ml odměrné baňky, případně 4 ml z 50 ml odměrné baňky (viz. *Tabulka 1*), přefiltrovány přes SPE kolonku a sledovaný analyt byl vymyt 2 ml metanolu. U vzorků, kde bylo pipetováno množství 4 ml, došlo ke zkoncentrování analytu. Přepočet koncentrace na gram reálného vzorku je tedy:

- pro vzorky, kde nebyl vzorek na SPE kolonce zkoncentrován (pipetovaný objem 2 ml)  
$$m_{50ml} [mg] = c [mg \cdot ml^{-1}] \cdot V_{50ml} [ml]$$

(5)

c...koncentrace z regresní rovnice

- pro vzorky, kde byl vzorek na SPE kolonce zkoncentrován (pipetovaný objem 4 ml)  
$$m_{50ml} [mg] = c [mg \cdot ml^{-1}] \cdot V_{50ml} [ml] / 2$$

(6)

c...koncentrace z regresní rovnice

Protože 50 ml extraktu bylo získáno z 1 g (nebo menšího množství, viz *Tabulka 1*), musí být přepočítáno podle vztahu:

$$c [mg \cdot g^{-1}] = \frac{m_{50ml} [mg]}{m_{vzorku} [g]}$$

(7)

### 3.11 Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru MS Excel 2007 a jsou uvedené ve tvaru průměr  $\pm s$  ( $n = 3$ ).

Výsledky byly dále statisticky zpracovány metodou ANOVA (parametrická jednofaktorová analýza rozptylu) a následně Duncanovým testem, pomocí statistického softwaru Statvyd verze 2.0 beta. Veškeré statistické testování bylo provedeno na hladině statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace separačního systému HPLC

#### 4.1.1 Výběr vhodné kolony a průtoku

K dispozici byly celkem 3 různé kolony. Na každé koloně byla provedena analýza standardů rutinů a kvercetinů při použití různých mobilních fází. Složení mobilních fází vycházelo z literatury [36, 37] nebo bylo upraveno na základě výsledků předchozích separací.

U kolon SUPELCO<sup>TM</sup>SIL LC-8DB a XBridge<sup>TM</sup> C18 se všemi použitými mobilními fázemi docházelo k deformaci píků pravděpodobně v důsledku degradace nebo kontaminace kolony. U některých mobilních fází navíc docházelo k nedostatečné separaci rutinů a kvercetinů. Tyto kolony tudíž nebyly vhodné pro tuto analýzu.

Jako nejvhodnější byla vybrána kolona SUPELCO<sup>TM</sup>SIL LC18-DB s mobilní fází voda : metanol : kyselina mravenčí v poměru 61,5 : 36,0 : 2,5. Při použití této kolony v kombinaci s uvedenou mobilní fází a průtokem 1 ml.min<sup>-1</sup> byl retenční čas analytu rutinů kolem 9–10 minut a kvercetinů kolem 35 minut, takže nedocházelo k interferencím píků. Chromatogram směsného standardu rutinů a kvercetinů je uveden v *Příloze 1*.

Detekce byla provedena pomocí detektoru diodového pole při 360 nm. Tato vlnová délka byla zvolena na základě literatury [36, 37].

#### 4.1.2 Rozpustnost standardu

Před samotnou analýzou bylo třeba vybrat vhodné rozpouštědlo, které bude použito pro přípravu kalibračních bodů a eluci rutinů zachyceného ze vzorků na SPE kolonkách.

Navážka rutinů se ve vodném prostředí téměř nerozpouštěla. Bylo nutné roztok před mikrofiltrací přefiltrovat ještě přes fritu. U roztoku rutinů v mobilní fázi došlo k rozpuštění vyššího podílu rutinů než v prvním případě, ale i přesto bylo nutné před mikrofiltrací použít fritu. U metanolu došlo k úplnému rozpuštění navážky rutinů. Chromatogramy jsou uvedené v *Přílohách 2–4*.

*Tabulka 2: Rozpustnost rutinů*

rozpouštědlo	navážka (g)	plocha píku ( $\mu\text{V.s}$ )	koncentrace ( $\text{mg.ml}^{-1}$ )	rozpuštěno (%)
metanol	0,0500	6943643	0,500	100,0
mobilní fáze	0,0500	2827192	0,201	40,3
voda	0,0500	61179	0,001	0,1

Koncentrace byla vypočítána způsobem uvedeným v kapitole 3.10.4.

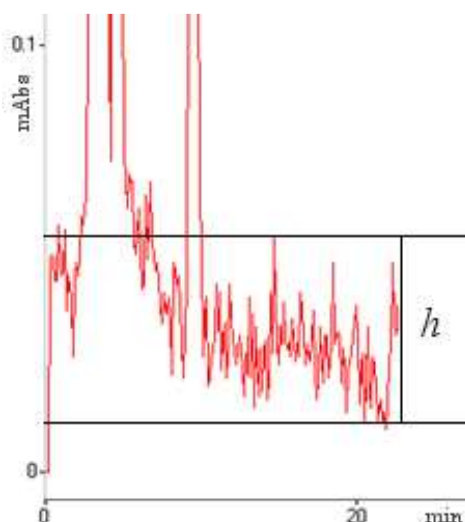
Z *Tabulky 2* je zřejmé, že nejvyšší rozpustnost má rutin v metanolu. Proto bylo toto rozpouštědlo vybráno pro další analýzu.

## 4.2 Validační parametry metody

### 4.2.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pološířka píku sledovaného analytu – rutinu byla stanovena 0,55 minut. Dvacetinásobek pološířky píku je tedy 11 minut. Po tuto dobu byla sledována základní linie slepého pokusu (Obrázek 8).

Maximální kolísání základní linie bylo určeno jako 0,043 mAbs (odezva detektoru – miliabsorbance).



Obrázek 8: Odezva signálu slepého pokusu sledovaná 11 minut

Při určení meze detekce a meze stanovitelnosti byly použity vztahy (1), (2), (3) a (4) uvedené v kapitole 3.9.1.

Kalibrační přímka koncentrační závislosti výšky měla tvar  $y = 557\,279,0361x + 336,4098$ ;  $b_1$  se tedy rovná 557 279,0361. Kalibrační závislost je uvedena v Grafu 1.

Odezva na mezi detekce:

$$y_D = 3h = 3 \cdot 0,043 = \underline{0,129 \text{ mAbs}}$$

Koncentrace na mezi detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} = \frac{0,129}{557279,0361} = \underline{\underline{2,31 \cdot 10^{-7} \text{ mg.ml}^{-1}}}$$

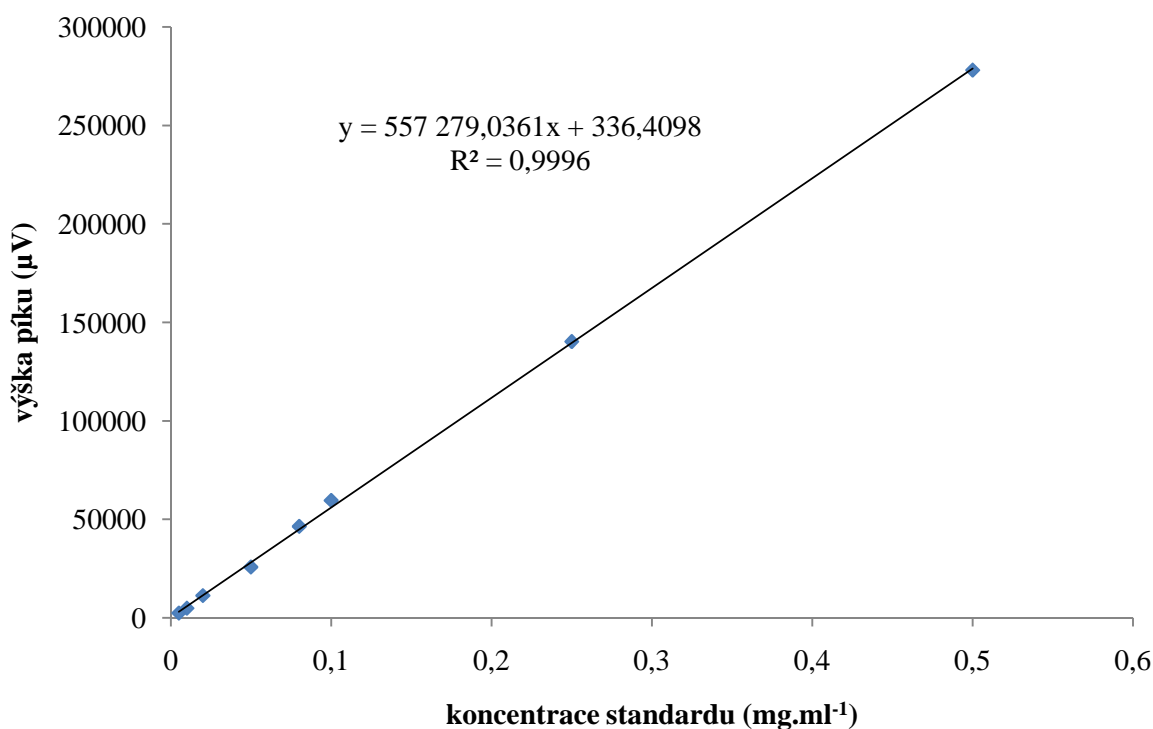
Odezva na mezi stanovitelnosti:

$$y_S = 10h = 10 \cdot 0,043 = \underline{0,43 \text{ mAbs}}$$

Koncentrace na mezi stanovitelnosti:

$$x_S = \frac{y_S}{b_1} = \frac{0,43}{557279,0361} = \underline{\underline{7,71 \cdot 10^{-7} \text{ mg.ml}^{-1}}}$$

Mez detekce rutinu byla stanovena na  $2,31 \cdot 10^{-7} \text{ mg.ml}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $7,71 \cdot 10^{-7} \text{ mg.ml}^{-1}$ .



Graf 1: Kalibrační závislost rutinu – závislost výšky píku na koncentraci

#### 4.2.2 Opakovatelnost

Pro určení opakovatelnosti byly vybrány tři roztoky o různých koncentracích. Každý roztok byl 6 x proměřen. Opakovatelnost byla následně vyjádřena jako RSD. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 3*. Opakovatelnost metody lze považovat za velmi dobrou ( $RSD < 1\%$ ).

Tabulka 3: Relativní směrodatná odchylka u vybraných koncentrací roztoků rutinu

koncentrace (mg.ml <sup>-1</sup> )	RSD (%)
0,5	0,549
0,1	0,559
0,01	0,555

#### 4.2.3 Linearita

Hodnota linearity byla stanovena z kalibrační závislosti rutinu (*Graf 2*). Hodnota R je 0,999 9, což je hodnota velmi blízká hodnotě 1. Závislost koncentrace a plochy píků rutinu je velmi těsná a tedy linearita metody (v koncentračním rozsahu 0,005–0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) velmi dobrá.

### 4.3 Identifikace a kvantifikace rutinu ve vzorcích

#### 4.3.1 Kalibrační křivka rutinu

K sestavení kalibrační křivky bylo připraveno 8 různých koncentrací standardního roztoku rutinu v metanolu (viz. kapitola 3.10.1). Takto připravené roztoky byly následně přefiltrovány přes mikrofiltr a analyzovány pomocí HPLC. Každá koncentrace byla třikrát proměřena. Průměrné hodnoty retenčního času, plochy a výšky píků ( $n = 3$ ) jsou uvedené v *Tabulce 4*, chromatogramy v *Přílohách 5–12*.

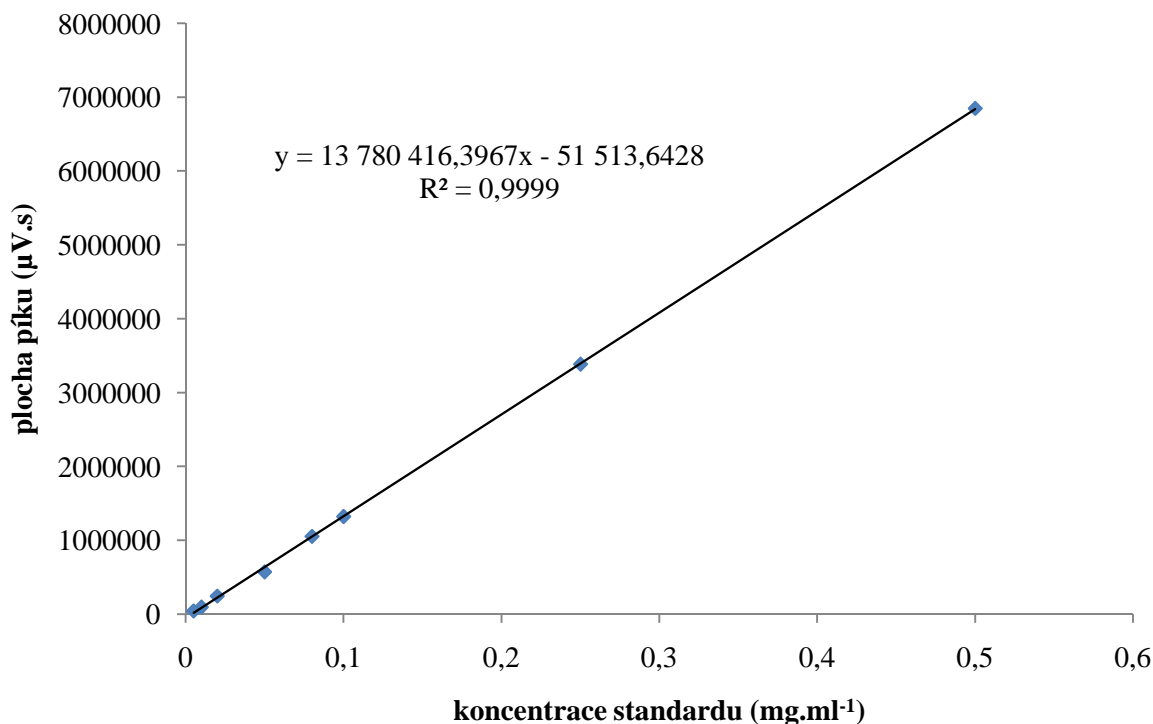
Tabulka 4: Průměrné hodnoty retenčního času, plochy a výšky píků kalibračních bodů

koncentrace (mg.ml <sup>-1</sup> )	retenční čas (min)	plocha píku (μV.s)	výška píku (μV)
0,5	9,43	6847414,0	278061,5
0,25	9,45	3386394,0	140206,0
0,1	9,11	1322073,5	59535,0
0,08	9,21	1054866,5	46364,0
0,05	9,28	574769,5	25729,5
0,02	9,32	246600,5	11246,5
0,01	9,38	98246,5	4818,0
0,005	9,40	44649,0	2369,0

V Grafu 2 je znázorněna kalibrační závislost rutinu. Rovnice regrese, která je následně použita pro výpočet koncentrace rutinu ve vzorcích, má tvar:

$$y = 13\,780\,416,3967x - 51\,513,6428$$

Koncentraci z ní lze vyjádřit takto:  $c = \frac{\text{plocha píku} + 51\,513,6428}{13\,780\,416,3967}$



Graf 2: Kalibrační závislost rutinu – závislost plochy píku na koncentraci

#### 4.3.2 Identifikace rutinu a kvercetinu ve vybraných vzorcích plodů bezu černého

Identifikace rutinu a kvercetinu byla provedena na základě retenčních časů pomocí fortifikace vzorků standardem. Byla ověřena přítomnost rutinu ve vzorcích, retenční čas

se pohyboval kolem 9–10 minuty. Dále byl ve vzorcích identifikován kvercetin. Jeho retenční čas byl 35 minut. Bylo tedy ověřeno, že nedochází k interferencím píků těchto dvou látek.

#### 4.3.3 Kvantifikace rutinu ve vzorcích plodů bezu černého

Byla provedena kvantifikace rutinu v 18 odrůdách bezu černého. Příprava vzorku, extrakce a samotná analýza pomocí HPLC byla provedena podle postupu uvedeného v kapitolách 3.5–3.8.

Koncentrace rutinu ve vzorcích a přepočet na gram sušiny byl proveden podle vztahů v kapitole 3.10.4. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 5*. Průměrné hodnoty ( $n = 3$ ) retenčních časů, výšky a plochy píků jsou uvedeny v tabulce v *Příloze 13*. Chromatogramy vybraných odrůd jsou uvedeny v *Přílohách 14–19*.

*Tabulka 5: Obsah rutinu ve vzorcích plodů bezu černého*

odrůda	c (mg.ml <sup>-1</sup> )	m <sub>50 ml</sub> (mg)	c (mg.g <sup>-1</sup> )*
Albida	0,13	6,70	6,70 ± 0,03
Allesö	0,06	3,23	3,23 ± 0,03
Aurea	0,02	1,24	1,24 ± 0,01
Bohatka	0,03	0,85	1,78 ± 0,01
Dana	0,06	1,46	2,18 ± 0,01
Haschberg	0,13	6,42	6,40 ± 0,24
Heidegg 13	0,05	2, 30	2,30 ± 0,01
Körsör	0,07	3,51	3,51 ± 0,03
Mammut	0,07	3,68	3,68 ± 0,02
planý bez	0,05	2,51	2,50 ± 0,39
Pregarten	0,11	5,68	5,68 ± 0,01
Riese aus Voßloch	0,07	3,68	3,68 ± 0,02
Sambo	0,11	5,53	5,53 ± 0,01
Sambu	0,13	6,41	6,41 ± 0,03
Samdal	0,08	4,03	4,03 ± 0,02
Sampo	0,10	5,09	5,09 ± 0,04
Samyl	0,07	3,54	3,50 ± 0,14
Weihenstephan	0,10	4,99	4,99 ± 0,05

\* obsah rutinu je uveden na gram sušiny

#### 4.4 Srovnání obsahu rutinu v analyzovaných odrůdách bezu černého

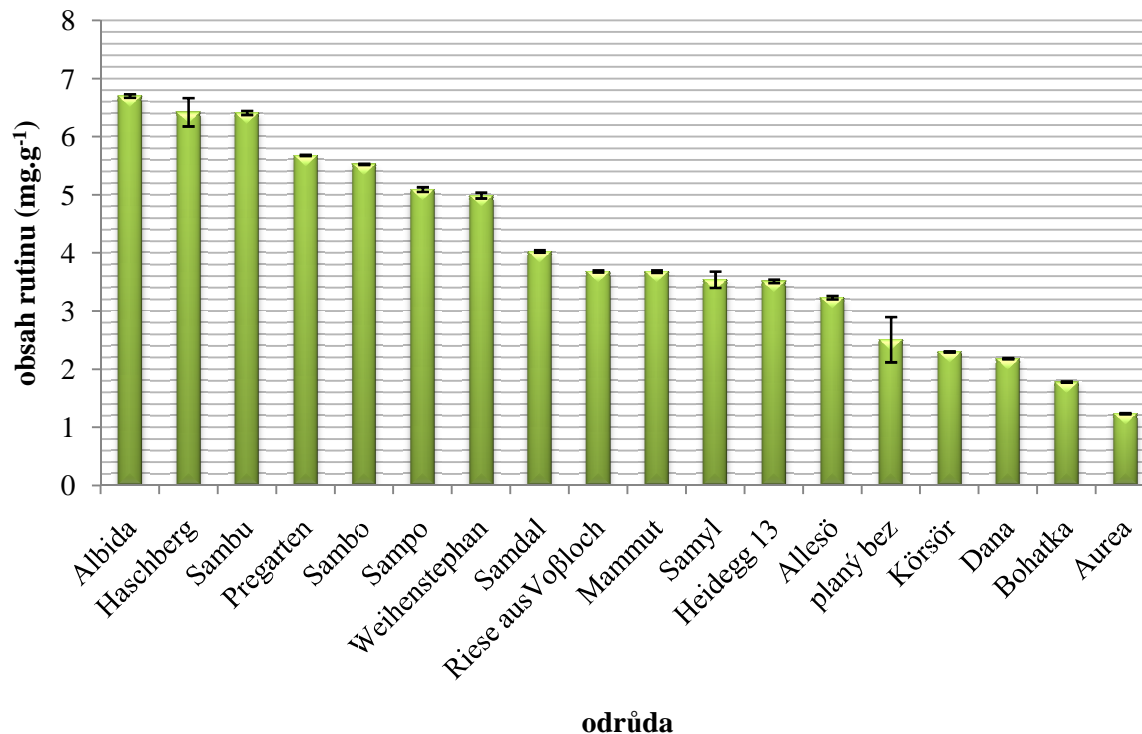
Celkem bylo analyzováno 18 odrůd. Následující tabulka (*Tabulka 6*) a graf (*Graf 3*) zobrazují významnost jednotlivých odrůd bezu černého z hlediska obsahu rutinu. Jak je patrné z *Grafu 3*, byly nalezeny významné ( $P < 0,05$ ) rozdíly mezi odrůdami v obsahu rutinu. Nejvyšší obsah této látky byl nalezen v odrůdě Albida, a to 6,70 mg v 1 g sušiny. Významná množství byla zjištěna také v odrůdách Haschberg, Sambu, Pregarten, Sambo a Sampo. Naopak nejmenší množství bylo naměřeno v odrůdách Bohatka a Aurea.

Zjištěné hodnoty řádově odpovídají literatuře, s níž byly srovnány [10].

Tabulka 6: Významnost odrůd bezu černého podle obsahu rutinu v plodech

odrůda	c (mg.g <sup>-1</sup> )*
Albida	6,70 ± 0,03
Haschberg	6,40 ± 0,24
Sambu	6,41 ± 0,03
Pregarten	5,68 ± 0,01
Sambo	5,53 ± 0,01
Sampo	5,09 ± 0,04
Weihenstephan	4,99 ± 0,05
Samdal	4,03 ± 0,02
Riese aus Voßloch	3,68 ± 0,02
Mammut	3,68 ± 0,02
Samyl	3,50 ± 0,14
Heidegg 13	3,51 ± 0,03
Allesö	3,23 ± 0,03
planý bez	2,50 ± 0,39
Körsör	2,30 ± 0,01
Dana	2,18 ± 0,01
Bohatka	1,78 ± 0,01
Aurea	1,24 ± 0,01

\* obsah rutinu je uveden na gram sušiny



Graf 3: Srovnání obsahu rutinu ve sledovaných odrůdách bezu černého



#### 4.5 Srovnání obsahu rutinu v plodech, větvičkách a listech bezu černého

Tato část práce je zaměřena na srovnání obsahu rutinu v různých částech rostliny bezu černého. Hodnoty koncentrací rutinu v listech a větvičkách jsou převzaty z diplomové práce Píšťkové [36]. Srovnání bylo provedeno pouze u šlechtěných odrůd, tedy 17 vzorků.

*Tabulka 7* zobrazuje zjištěné koncentrace rutinu v plodech, listech a větvičkách 17 šlechtěných odrůd bezu černého. *Grafy 4 a 5* přehledně srovnávají množství rutinu v jednotlivých částech rostliny. Z tabulky i grafů je zřetelně vidět, že nejvyšší koncentrace ( $P < 0,05$ ) rutinu se vyskytují v listech bezu černého. Hodnoty koncentrace rutinu v plodech jsou až pětkrát, u některých odrůd až desetkrát, nižší než v listech. Zároveň jsou opět patrné významné ( $P < 0,05$ ) rozdíly mezi odrůdami. Až na dvě výjimky (odrůdy Aurea a Samyl) byly nejnižší koncentrace rutinu nalezeny v bezových větvičkách. Nejvyšší obsah rutinu v listech byl zjištěn u odrůdy Pregarten, v plodech, jak již bylo řečeno v kapitole 4.4, v odrůdě Albida a ve větvičkách u odrůdy Samyl.

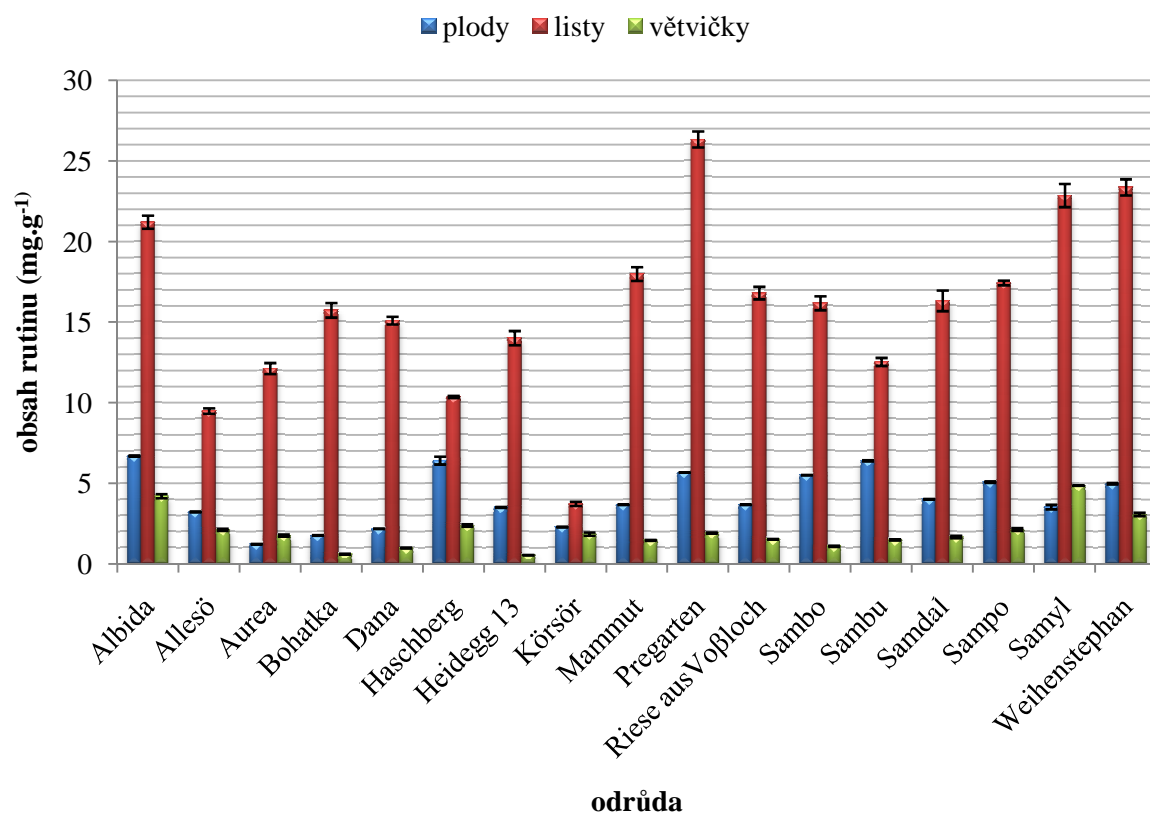
*Tabulka 7: Koncentrace rutinu v plodech, listech a větvičkách*

odrůda	c (mg.g <sup>-1</sup> )*		
	plody	listy**	větvičky**
Albida	6,70 ± 0,03	21,21 ± 0,41	4,21 ± 0,13
Allesö	3,23 ± 0,03	9,49 ± 0,17	2,13 ± 0,06
Aurea	1,24 ± 0,01	12,13 ± 0,34	1,77 ± 0,06
Bohatka	1,78 ± 0,01	15,74 ± 0,45	0,62 ± 0,02
Dana	2,18 ± 0,01	15,10 ± 0,24	0,99 ± 0,03
Haschberg	6,40 ± 0,24	10,37 ± 0,06	2,39 ± 0,08
Heidegg 13	3,51 ± 0,03	14,02 ± 0,44	0,56 ± 0,01
Körsör	2,30 ± 0,01	3,74 ± 0,13	1,86 ± 0,10
Mammut	3,68 ± 0,02	17,99 ± 0,43	1,47 ± 0,03
Pregarten	5,68 ± 0,01	26,34 ± 0,50	1,93 ± 0,02
Riese aus Voßloch	3,68 ± 0,02	16,81 ± 0,39	1,54 ± 0,02
Sambo	5,53 ± 0,01	16,18 ± 0,43	1,11 ± 0,04
Sambu	6,41 ± 0,03	12,54 ± 0,25	1,50 ± 0,03
Samdal	4,03 ± 0,02	16,33 ± 0,64	1,68 ± 0,07
Sampo	5,09 ± 0,04	17,44 ± 0,14	2,15 ± 0,08
Samyl	3,50 ± 0,14	22,86 ± 0,72	4,87 ± 0,01
Weihenstephan	4,99 ± 0,05	23,37 ± 0,50	3,08 ± 0,10

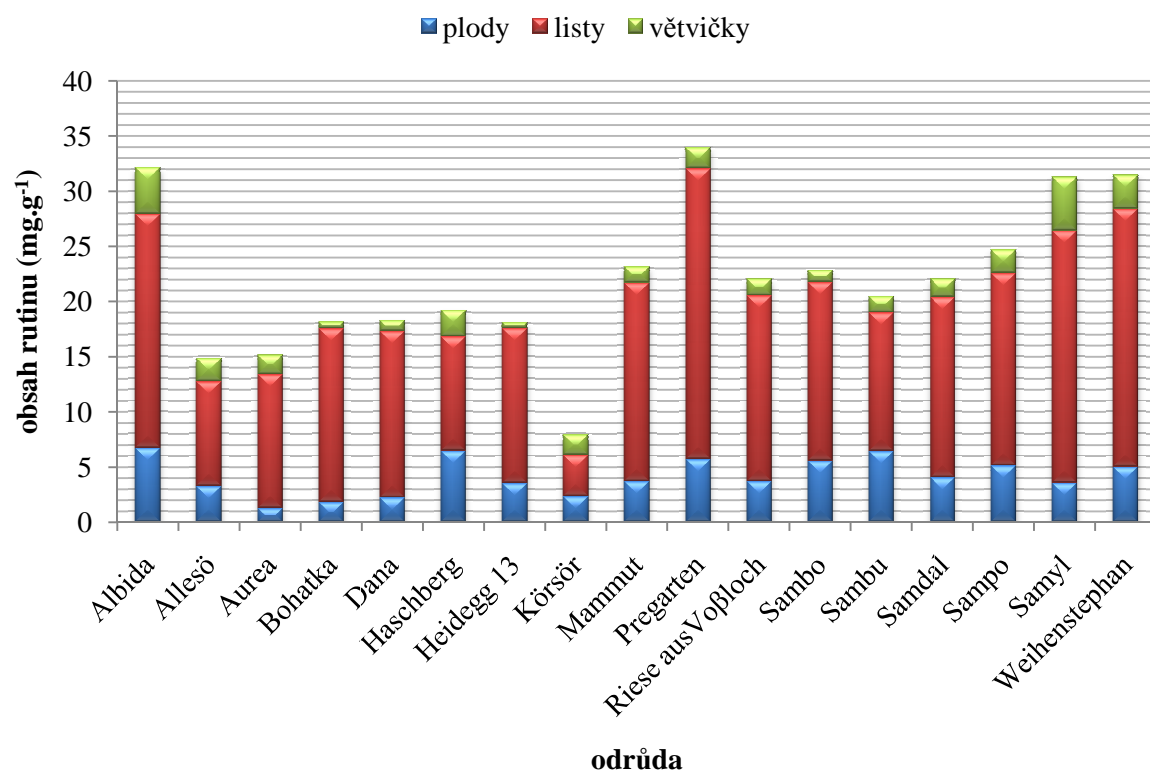
\* obsah rutinu je uveden na gram sušiny

\*\* hodnoty převzaté z DP Píšťkové [36]

Celkově na rutin nejbohatšími odrůdami jsou Pregarten, Albida, Weihenstephan a Samyl. Nejnižší množství bylo zjištěno u odrůdy Körsör.



Graf 4: Srovnání obsahu rutinu v plodech, listech a větvičkách 17 odrůd bezu černého



Graf 5: Srovnání obsahu rutinu v plodech, listech a větvičkách 17 odrůd bezu černého

#### 4.6 Srovnání obsahu rutinu v plodech bezu černého s významnými zdroji rutinu

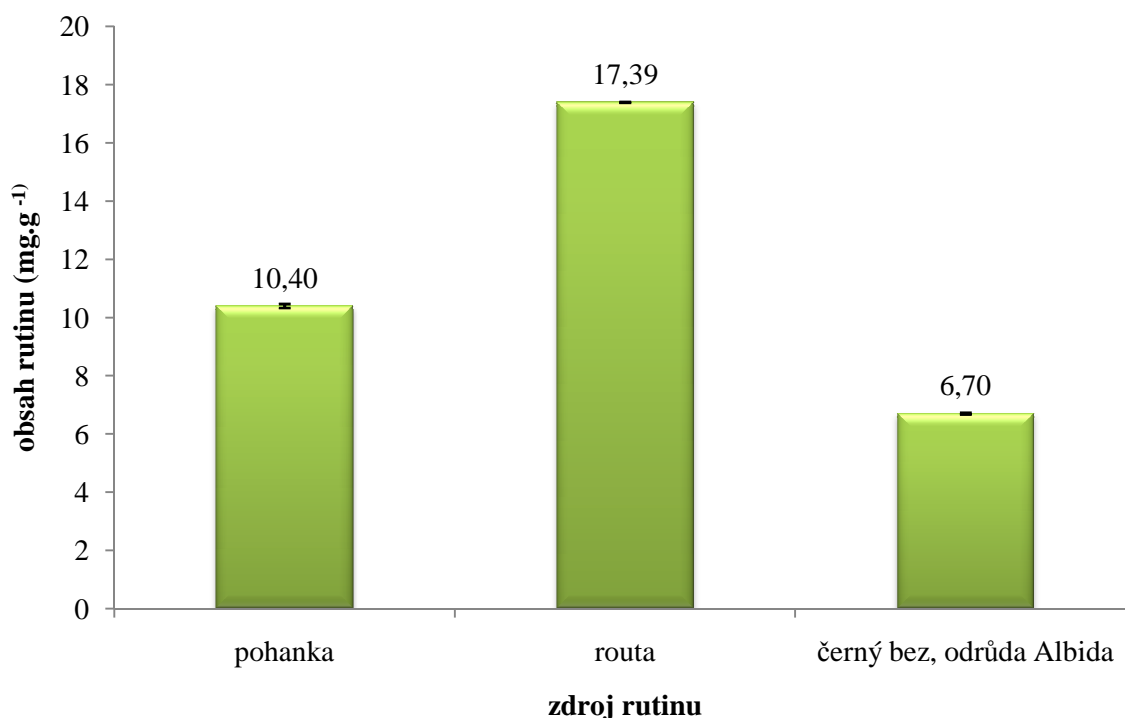
Jako významné zdroje rutinu byly pro porovnání vybrány pohanka a ruta. Pohanka jako nejznámější a v dietě nejvýznamnější zdroj rutinu a ruta, protože jde o rostlinu, z níž byl rutin poprvé izolován. Vzorky routy a pohanky byly zpracovány a analyzovány stejným způsobem jako vzorky plodů černého bezu (viz. 3.5–3.8). Jediným rozdílem bylo, že byly zakoupeny už sušené.

Zjištěné koncentrace jsou uvedeny v *Tabulce 8*. Z tabulky je patrné, že jde o skutečně významné zdroje rutinu. Naměřené hodnoty koncentrace jsou v případě routy téměř trojnásobně vyšší než u odrůdy Albida, která byla z analyzovaných odrůd bezu černého na rutin nejbohatší. Množství rutinu v nati routy bylo stanoveno na  $17,39 \text{ mg.g}^{-1}$  a v pohance  $10,40 \text{ mg.g}^{-1}$ .

*Tabulka 8: Obsah rutinu v pohance a routě*

zdroj	c ( $\text{mg.ml}^{-1}$ )	$m_{50 \text{ ml}}$ (mg)	c ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
pohanka	0,21	10,40	$10,40 \pm 0,07$
ruta	0,35	17,39	$17,39 \pm 0,01$

V *Grafu 6* je srovnán obsah rutinu v pohance, routě a na rutin nejbohatší odrůdě černého bezu, odrůdě Albida.



*Graf 6: Srovnání obsahu rutinu v pohance, routě a odrůdě černého bezu Albida*

## 5 ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce podává přehled o vlastnostech, využití a obsahových látkách bezu černého. Stručně popisuje jeho úlohu v lidovém léčitelství, moderní medicíně, v potravinářství a možnosti jeho dalšího využití. Z obsahových látek jsou zde popsány vitamíny, minerální látky sacharidy, organické kyseliny, kyanogenní glykosidy, aromatické látky a zejména flavonoidy, mezi něž patří i rutin. Kromě přehledu chemických vlastností a biologických účinků rutinu jsou zde uvedeny možnosti jeho stanovení a zdroje, kde je možné ho nalézt.

Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci podmínek stanovení rutinu metodou HPLC, validaci metody a samotnou identifikaci a kvantifikaci rutinu ve vzorcích bezu černého. K extrakci rutinu z rostlinné matrice byla použita extrakce stlačenou horkou vodou. Probíhala ve třech cyklech po pěti minutách při teplotě 100 °C a tlaku 15 MPa. Extrakty byly následně přečištěny pomocí SPE kolonek. Celkem bylo analyzováno 17 šlechtěných odrůd bezu černého (Albida, Allesö, Aurea, Bohatka, Dana, Haschberg, Heidegg 13, Körsör, Mammut, Pregarten, Riese aus Voßloch, Sambo, Sambu, Samdal, Sampo, Samyl, Weihenstephan) a jedna planá odrůda. Pro srovnání byly analyzovány ještě dva významné zdroje rutinu v potravě, routa a pohanka.

Pro HPLC analýzu byla jako optimální vybrána kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup>LC18-DB s mobilní fází voda : metanol : kyselina mravenčí v poměru 61,5 : 36,0 : 2,5. Průtok byl zvolen 1 ml.min<sup>-1</sup> a detekce provedena pomocí detektoru diodového pole při 360 nm. Mez detekce rutinu byla stanovena na 2,31.10<sup>-7</sup> mg.ml<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 7,71.10<sup>-7</sup> mg.ml<sup>-1</sup>.

Nejvyšší koncentrace rutinu byla zjištěna v plodech odrůdy Albida, a to 6,70 ± 0,03 mg v 1 g sušiny. Vysoké koncentrace rutinu obsahovaly také odrůdy Haschberg, Sambu, Pregarten, Sambo a Sampo. Naopak nejnižší koncentrace byla naměřena v plodech odrůdy Aurea, 1,24 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup>.

Zjištěné koncentrace rutinu v plodech byly porovnány s nalezeným obsahem rutinu v listech a větvičkách bezu černého. Nejbohatší část rostliny jsou bezesporu listy. Obsahují několikanásobně vyšší koncentrace rutinu než plody i větvičky. Plody jsou v obsahu rutinu na druhém místě a nejmenší koncentrace byly nalezeny ve větvičkách.

Obsah rutinu v natí routy vonné byl 17,39 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup> a v pohance 10,40 ± 0,07 mg.g<sup>-1</sup>. Tyto koncentrace jsou přibližně dvakrát až třikrát vyšší než nejvyšší koncentrace rutinu v plodech bezu černého.

Je zřejmé, že se černý bez řadí k důležitým zdrojům významného flavonoidu rutinu. Plody, větvičky a zejména pak listy jsou vhodnou matricí, z níž lze relativně snadno tuto biologicky aktivní sloučeninu extrahovat. Plody černého bezu mohou být významným zdrojem rutinu například v potravinářském a nápojovém průmyslu. Listy a větvičky, které jsou často považovány pouze za odpad, by se mohly stát levným zdrojem rutinu pro výživové doplňky a léčiva. V dnešní době rozvoje civilizačních chorob je velmi důležité hledat levné a dostupné zdroje biologicky aktivních látek, jak pro prevenci, tak i léčbu těchto závažných onemocnění. Rutin mezi takové látky zcela jistě patří.

V další práci by bylo vhodné zhodnotit vliv doby skladování na koncentraci rutinu a dále porovnání obsahu rutinu v plodech různých ročníků sběru. Užitečné by jistě bylo stanovení obsahu rutinu v květech bezu černého. Právě ty jsou totiž používány k výrobě velmi oblíbeného bezového sirupu. Zajímavé údaje by jistě poskytlo také stanovení dalších

flavonoidních látek, zejména antokyanů. Přínosem by mohlo být také stanovení toxického sambunigrinu a srovnání jeho obsahu ve šlechtěných a planých odrůdách.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KAŇOVÁ, Kateřina. *Stanovení aromaticky aktivních látek bezu černého*. Brno, 2011. 61 s. Bakalářská práce. Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [2] VEBERIC, Robert, Jerneja JAKOPIC, Franci STAMPAR a Valentina SCHMITZER. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, roč. 114, č. 2, s. 511–515. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080.
- [3] LEE, Jungmin a Chad E. FINN. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, roč. 87, č. 14, s. 2665–2675. ISSN 00225142. DOI: 10.1002/jsfa.3029.
- [4] JORDHEIM, Monica, Nils Harald GISKE a Øyvind M. ANDERSEN. Anthocyanins in Caprifoliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007, roč. 35, č. 3, s. 153–159. ISSN 03051978. DOI: 10.1016/j.bse.2006.09.010.
- [5] JØRGENSEN, Ulla, Merete HANSEN, Lars P. CHRISTENSEN, Karina JENSEN a Karl KAACK. Olfactory and Quantitative Analysis of Aroma Compounds in Elder Flower (*Sambucus nigra* L.) Drink Processed from Five Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, roč. 48, č. 6, s. 2376–2383. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf000005f.
- [6] KAACK, Karl, Lars P. CHRISTENSEN, Martin HUGHES a Robert EDER. The relation ship between sensory quality and volatile compounds in raw juice processed from elderberries (*Sambucus nigra* L.). *European Food Research and Technology*. 2005, roč. 221, č. 3–4, s. 244–254. ISSN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-005-1141-4.
- [7] LIM, Tong Kwee. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. New York: Springer, 2012, 851 s. ISBN 978-90-481-8660-0.
- [8] AKBULUT Mustafa, Sezai ERCISLI a Murat TOSUN. Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*. 2009, roč. 5, č. 20, s. 320–323. ISSN 0973-1296. DOI: 10.4103/0973-1296.58153.
- [9] RUPASINGHE, H. P. Vasantha a Steve CLEGG. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, roč. 20, č. 2, s. 133–137. ISSN 08891575. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.06.008.
- [10] KAACK, Karl, Xavier C. FRETTE, Lars P. CHRISTENSEN, Anne-Katrine LANDBO a Anne S. MEYER. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited

for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*. 2008, roč. 226, č. 4, s. 843–855. ISSN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-007-0605-0.

[11] GONZÁLEZ-MOLINA, Elena, Amadeo GIRONÉS-VILAPLANA, Pedro MENA, Diego A. MORENO a Cristina GARCÍA-VIGUERA. New Beverages of Lemon Juice with Elderberry and Grape Concentrates as a Source of Bioactive Compounds. *Journal of Food Science*. 2012, roč. 77, č. 6, s. C727–C733. ISSN 00221147. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02715.x.

[12] CHARLEBOIS, Daniel. Elderberry as a medicinal plant. *Issues in new crops and new uses*. 2007, s. 284–292. Dostupné z: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu07/pdfs/charlebois284-292.pdf>

[13] KAACK, Karl a Thomas AUSTED. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1998, roč. 52, č. 3, s. 187–198. ISSN 09219668. DOI: 10.1023/A:1008069422202.

[14] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin* 2. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.

[15] VOILLEY Andrée a Patrick ETIÉVANT. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006, 451 s. ISBN 18-557-3960-7.

[16] KAACK, Karl, Lars P. CHRISTENSEN, Martin HUGHES a Robert EDER. Relationship between sensory quality and volatile compounds of elderflower (*Sambucus nigra* L.) extracts. *European Food Research and Technology*. 2006, roč. 223, č. 1, s. 57–70. ISSN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-005-0122-y.

[17] KAACK, Karl. Aroma composition and sensory quality of fruit juices processed from cultivars of elderberry (*Sambucus nigra* L.). *European Food Research and Technology*. 2008, roč. 227, č. 1, s. 45–56. ISSN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-007-0691-z.

[18] KELLER, B. Raymond. *Flavonoids biosynthesis, biological effects and dietary sources*. New York: Nova Science Publishers, 2009. ISBN 978-161-7619-144.

[19] GROTEWOLD, Erich. *The science of flavonoids*. New York: Springer, 2006, s. 273. ISBN 978-038-7288-215.

[20] HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002, roč. 96, č. 2–3, s. 67–202. ISSN 01637258. DOI: 10.1016/S0163-7258(02)00298-X.

[21] ŠKERGET, Mojca, Petra KOTNIK, Majda HADOLIN, Andreja Rižner HRAŠ, Marjana SIMONIČ a Željko KNEZ. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2005, roč. 89, č. 2, s. 191–198. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025.

[22] MILBURY, Paul E., Guohua CAO, Ronald L. PRIOR a Jeffrey BLUMBERG. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2002, roč. 123, č. 8, s. 997–1006. ISSN 00476374. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00383-9.

[23] NETZEL, Michael, Gabriele STRASS, Michael HERBST, Helmut DIETRICH, Roland BITSCH, Irmgard BITSCH a Till FRANK. The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. *Food Research International*. 2005, roč. 38, č. 8–9, s. 905–910. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.03.010.

[24] DAWIDOWICZ, Andrzej L., Dorota WIANOWSKA a Barbara BARANIAK. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology*. 2006, roč. 39, č. 3, s. 308–315. ISSN 00236438. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.01.005.

[25] WACH, Anna, Krystyna PYRZYŃSKA a Magdalena BIESAGA. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*. 2007, roč. 100, č. 2, s. 699–704. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.10.028.

[26] ERLUND, Iris, Timo KOSONEN, Georg ALFTHAN, Jouni MÄENPÄÄ, Kristiina PERTTUNEN, Juha KENRAALI, Josua PARANTAINEN a Antti ARO. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2000, roč. 56, č. 8, s. 545–553. ISSN 0031-6970. DOI: 10.1007/s002280000197.

[27] ČOPIKOVÁ, Jana, Michal UHER, Oldřich LAPČÍK, Jitka MORAVCOVÁ a Pavel DRAŠAR. Přírodní barevné látky. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 802–806. Dostupné z: <http://www.oprava-karbon.tym.cz/vyziva/Po%EDrodn%ED%20barevn%E9%20l%E1tky.pdf>

[28] VESPALCOVÁ, Milena, Jitka CETKOVSKÁ, Barbora HOHNOVÁ, Lenka ŠTAVÍKOVÁ a Aleš MATĚJÍČEK. Rutin v odpadu z výsadeb bezu černého. *Chemické listy*. 2012, č. 106.

[29] STANELY MAINZEN PRINCE, Ponnian a Shanmuga PRIYA. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences. *European Journal of Pharmacology*. 2010, roč. 649, č. 1–3, s. 229–235. ISSN 00142999. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.08.054.

[30] FUSI, Fabio, Simona SAPONARA, Federica PESSINA, Beatrice GORELLI a Giampietro SGARAGLI. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations. *European Journal of Nutrition*. 2003, roč. 42, č. 1, s. 10–17. ISSN 1436-6207. DOI: 10.1007/s00394-003-0395-5.

[31] GHIASI, Mina, Afsaneh AZADNIA, Masoud ARABIEH a Mansour ZAHEDI. Protective effect of rutin (vitamin p) against heme oxidation: A quantum mechanical



approach. *Computational and Theoretical Chemistry*. 2012, roč. 996, s. 28–36. ISSN 2210271x. DOI: 10.1016/j.comptc.2012.07.009

[32] HAN, Yongmoon. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*. 2009, roč. 9, č. 2, s. 207–211. ISSN 15675769. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.11.002.

[33] HAO, Hui-hui, Zhu-min SHAO, Dao-quan TANG, Qian LU, Xu CHEN, Xiao-xing YIN, Jing WU a Hui CHEN. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Life Sciences*. 2012, roč. 91, č. 19–20, s. 959–967. ISSN 00243205. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.09.003.

[34] JE, Hyun Dong, Chang Yell SHIN, Sun Young PARK, Sung Hyuk YIM, Chan KUM, In Hoi HUH, Jin Hak KIM a Uy Dong SOHN. Combination of vitamin c and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats. *Archives of Pharmacal Research*. 2002, roč. 25, č. 2, s. 184–190. ISSN 0253-6269. DOI: 10.1007/BF02976561.

[35] FERNANDES, Ana Angélica Henrique, Ethel Lourenzi Barbosa NOVELLI, Katashi OKOSHI, Marina Politi OKOSHI, Bruno Paulino Di MUZIO, Julliano F. Campos GUIMARÃES a Ary Fernandes JUNIOR. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine*. 2010, roč. 64, č. 3, s. 214–219. ISSN 07533322. DOI: 10.1016/j.biopha.2009.08.007.

[36] PÍŠŤKOVÁ, Magdalena. *Obsah rutinu ve vybraných odrůdách bezu černého*. Brno, 2011. Diplomová práce. Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

[37] HOHNOVÁ, Barbora. *Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce*. Brno, 2010. Disertační práce. Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

[38] DAWIDOWICZ, Andrzej L. a Dorota WIANOWSKA. Application of the MSPD Technique for the HPLC Analysis of Rutin in *Sambucus nigra* L.: The Linear Correlation of the Matrix Solid-Phase Dispersion Process. *Journal of Chromatographic Science*. 2009, č. 47.

[39] DAWIDOWICZ, Andrzej L. a Dorota WIANOWSKA. PLE in the analysis of plant compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, roč. 37, č. 5, s. 1161–1165. ISSN 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.10.025.

[40] SEABRA, Inês J., Mara E. M. BRAGA, Maria T. P. BATISTA a Hermínio C. SOUSA. Fractioned High Pressure Extraction of Anthocyanins from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Pomace. *Food and Bioprocess Technology*. 2010, roč. 3, č. 5, s. 674–683. ISSN 1935-5130. DOI: 10.1007/s11947-008-0134-2.

- [41] LI, Peng, Shao Ping LI a Yi Tao WANG. Optimization of CZE for analysis of phytochemical bioactive compounds. *Electrophoresis*. 2006, roč. 27, č. 23, s. 4808–4819. ISSN 01730835. DOI: 10.1002/elps.200600219.
- [42] URBÁNEK, Marek, Marie POSPÍŠILOVÁ a Miroslav POLÁŠEK. On-line coupling of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis for the assay of phenolic compounds in plant extracts. *Electrophoresis*. 2002, roč. 23, 7–8. ISSN 0173–0835.
- [43] CHEN, Chien-Chih, Yu-Lin HUANG, Fei-In HUANG, Chun-Wen WANG a Jun-Chih OU. Water-Soluble Glycosides from *Ruta graveolens*. *Journal of Natural Products*. 2001, roč. 64, č. 7, s. 990–992. ISSN 0163-3864. DOI: 10.1021/np000582y.
- [44] PREETHI, K. C., Girija KUTTAN a Ramadasan KUTTAN. Anti-tumour activity of *Ruta graveolens* extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006, roč. 7, s. 439–443.
- [45] ADAM, Martin, Petr DOBIÁŠ, Aleš EISNER a Karel VENTURA. Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. *Journal of Separation Science*. 2009, roč. 32, č. 2, s. 288–294. ISSN 16159306. DOI: 10.1002/jssc.200800543.
- [46] KIM, Kyoung Heon, Ki Won LEE, Dong Young KIM, Hyung Hwan PARK, Ik Boo KWON a Hyong Joo LEE. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresource Technology*. 2005, roč. 96, č. 15, s. 1709–1712. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.12.025.
- [47] JIANG, Ping, Frank BURCZYNSKI, Clayton CAMPBELL, Grant PIERCE, Jose A. AUSTRIA a Colin J. BRIGGS. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*. 2007, roč. 40, č. 3, s. 356–364. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.10.009.
- [48] ŠTOČKOVÁ, Lenka, Eva MATĚJOVÁ, Dagmar JANOVSKÁ a Světlana SÝKOROVÁ. Porovnání výsledků tří analytických metod pro stanovení obsahu rutinu v pohance tatarské. *Chemické Listy*. 2009, č. 103, s. 327–831.
- [49] ROTH, Michal. Extrakce stlačenými tekutinami k přípravě organických vzorků pro analýzu. *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha: VŠCHT, 2006, s. 106–112.
- [50] TEO, Chin Chye, Swee Ngin TAN, Jean Wan Hong YONG, Choy Sin HEW a Eng Shi ONG. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, č. 16, s. 2484–2494. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.050.
- [51] ONG, Eng Shi, Jane Si Han CHEONG a David GOH. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal*

*of Chromatography A.* 2006, roč. 1112, č. 1–2, s. 92–102. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.052.

[52] ONG, Eng Shi a Shea Mei LEN. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta.* 2003, roč. 482, č. 1, s. 81–89. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00196-X.

[53] DENEV, Petko, Milan CIZ, Gabriela AMBROZOVA, Antonin LOJEK, Irina YANAKIEVA a Maria KRATCHANOVA. Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry.* 2010, roč. 123, č. 4, s. 1055–1061. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.061.

[54] HIGSON, Séamus. *Analytical chemistry.* Oxford: Oxford University Press, 2004, 453 s. ISBN 978-0-19-850289-0.

[55] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques.* 2. vyd. Hoboken, NJ: John Wiley, 2007. ISBN 978-047-0859-049.

[56] MICHALKIEWICZ, Anna, Magdalena BIESAGA a Krystyna PYRZYNSKA. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A.* 2008, roč. 1187, č. 1–2, s. 18–24. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.02.001.

[57] ISHII, Kazuo, Takashi FURUTA a Yasuji KASUYA. High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of chromatography B.* 2003, č. 794. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00398-2.

[58] ACKLEY, Kathryn L. a Joseph A. CARUSO. Liquid Chromatography. *Handbook of elemental speciation: techniques and methodology.* Chichester: Wiley, 2003, s. 148–162. ISBN 04-714-9214-0.

[59] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999, 2011 [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

LDL	low density lipoprotein; nízkodenzitní lipoprotein
PLE	pressurized liquid extraction; kapalinová extrakce podporovaná tlakem
BHT	2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol
MSDP	matrix solid phase dispersion; extrakce disperzní tuhou fází
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
UV-VIS	ultraviolet – visible; ultrafialové – viditelné světlo
SFE	subcritical fluid extraction; superkritická fluidní extrakce
MAE	microwave assisted extraction; mikrovlnná extrakce
SPE	solid phase extraction; extrakce na pevné fázi
HPLC	high performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HLB	hydrophilic lipophilic balanced; hydrofilně modifikovaný
RSD	relativní směrodatná odchylka
mAbs	odezva detektoru - miliabsorbance

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram směsného standardu rutinu a kvercetinu

Příloha 2: Chromatogram standardu rutinu ve vodě

Příloha 3: Chromatogram standardu rutinu v mobilní fázi

Příloha 4: Chromatogram standardu rutinu v metanolu

Příloha 5: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 6: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 7: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 8: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,08 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 9: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 10: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 11: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,01 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 12: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,005 \text{ mg.ml}^{-1}$

Příloha 13: Tabulka průměrných hodnot retenčních časů, ploch a výšek píků u kvantifikace rutinu ve vzorcích bezu černého

Příloha 14: Chromatogram odrůdy Albida

Příloha 15: Chromatogram odrůdy Allesö

Příloha 16: Chromatogram odrůdy Haschberg

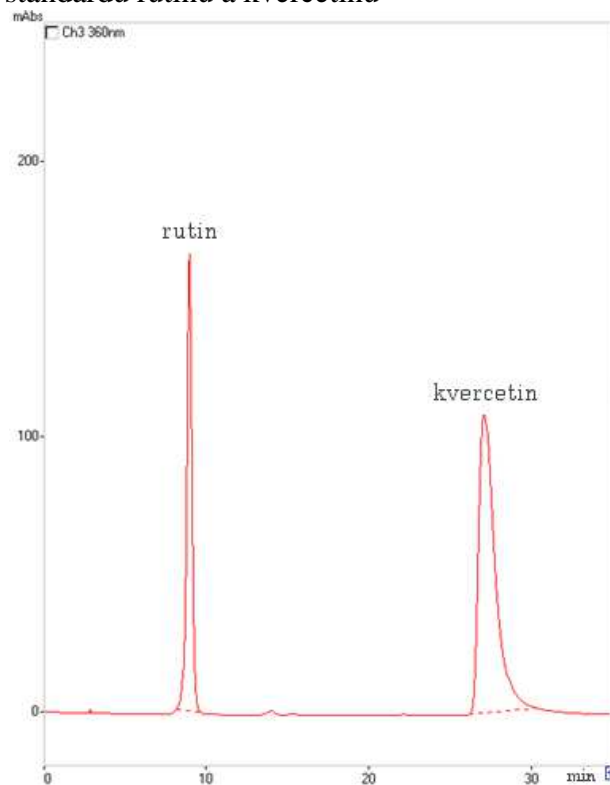
Příloha 17: Chromatogram odrůdy Pregarten

Příloha 18: Chromatogram odrůdy Sambu

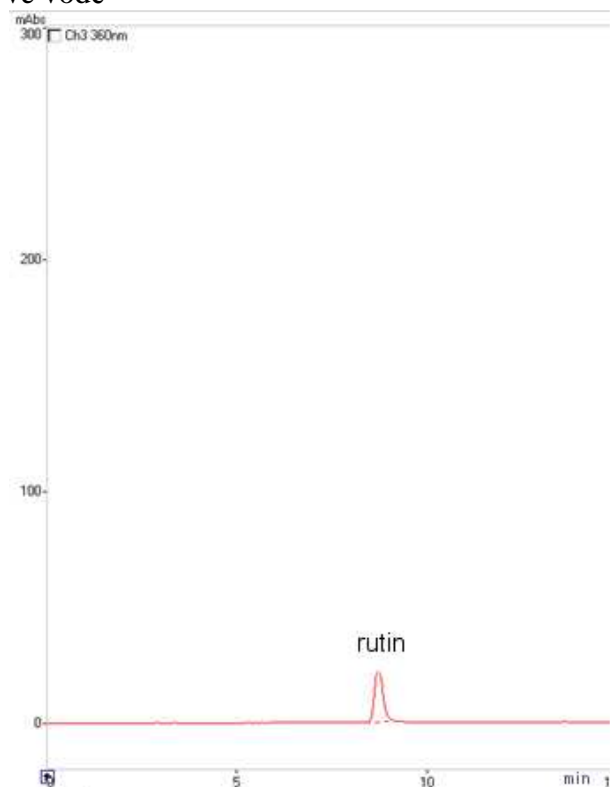
Příloha 19: Chromatogram odrůdy Weihenstephan

## 9 PŘÍLOHY

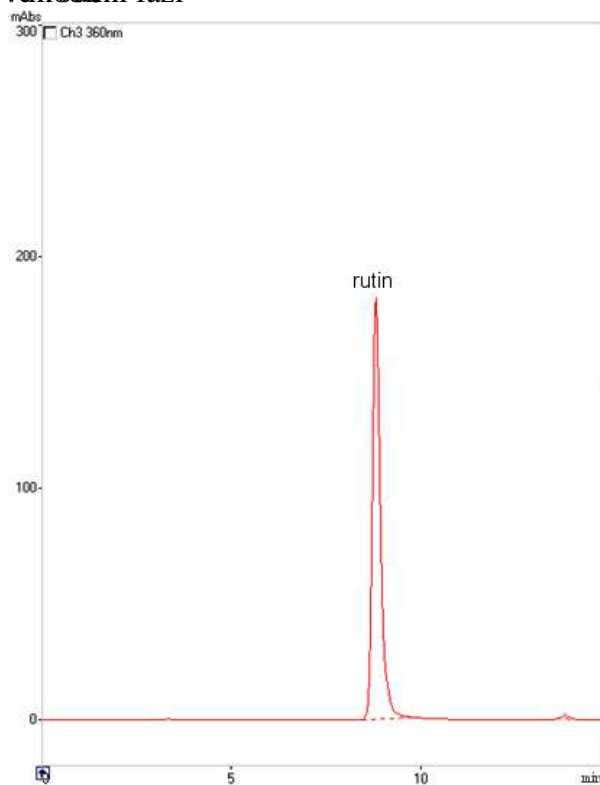
Příloha 1: Chromatogram směsného standardu rutinu a kvercetin



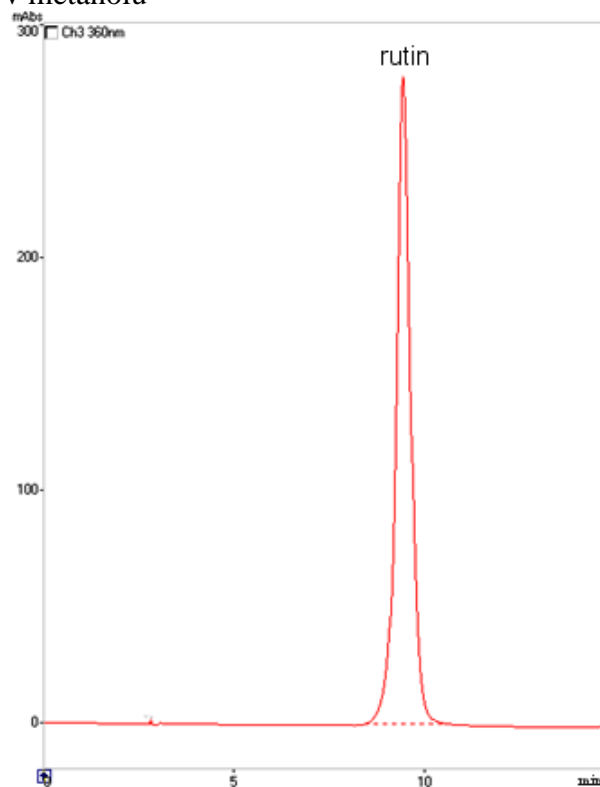
Příloha 2: Chromatogram standardu rutinu ve vodě



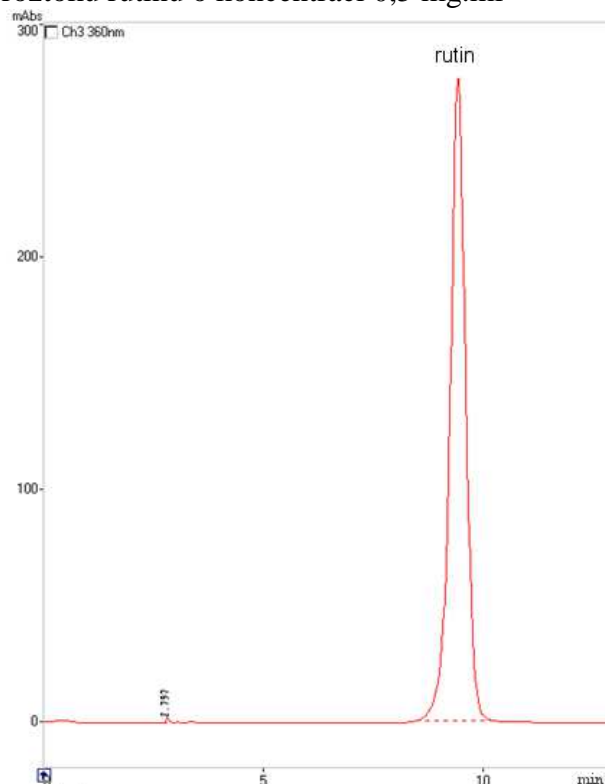
Příloha 3: Chromatogram standardu rutinu v mobilní fázi



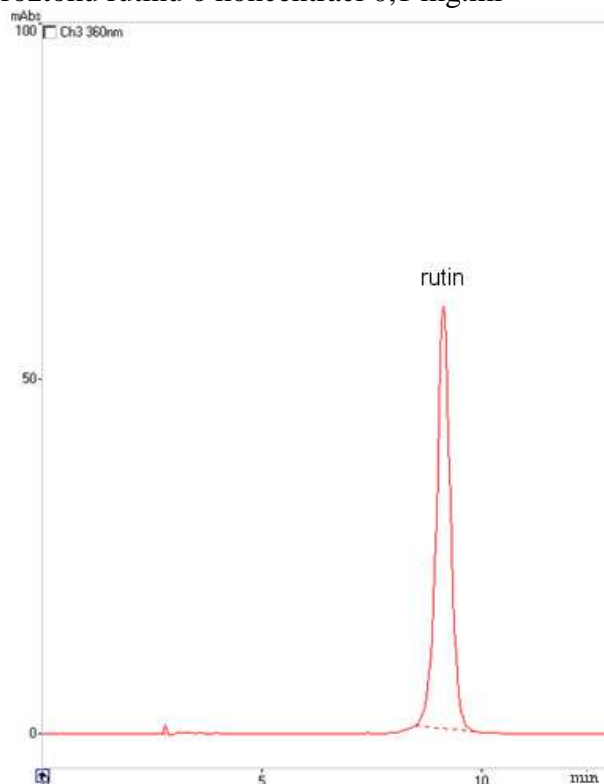
Příloha 4: Chromatogram standardu rutinu v metanolu



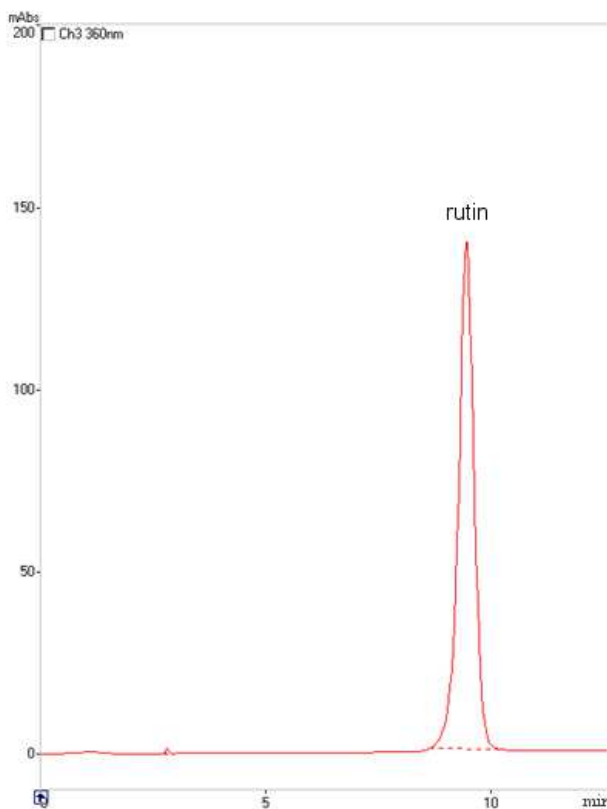
Příloha 5: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$



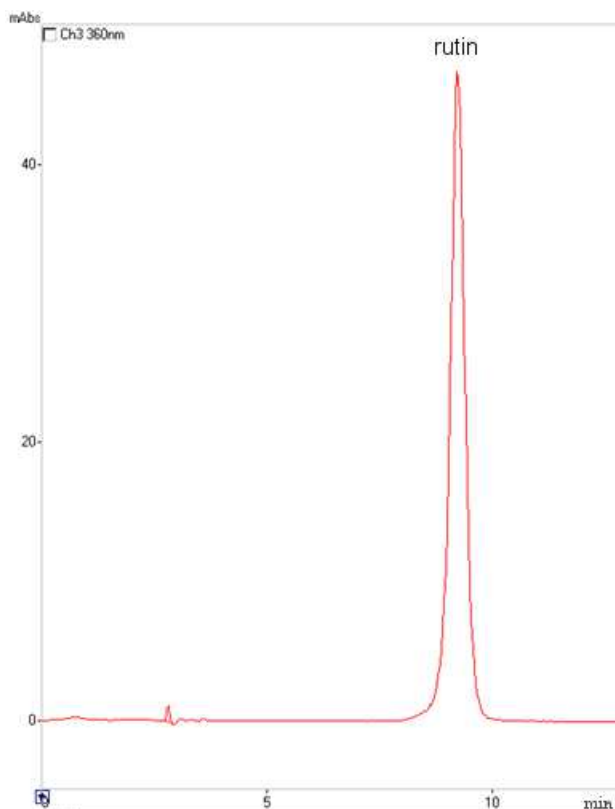
Příloha 7: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$



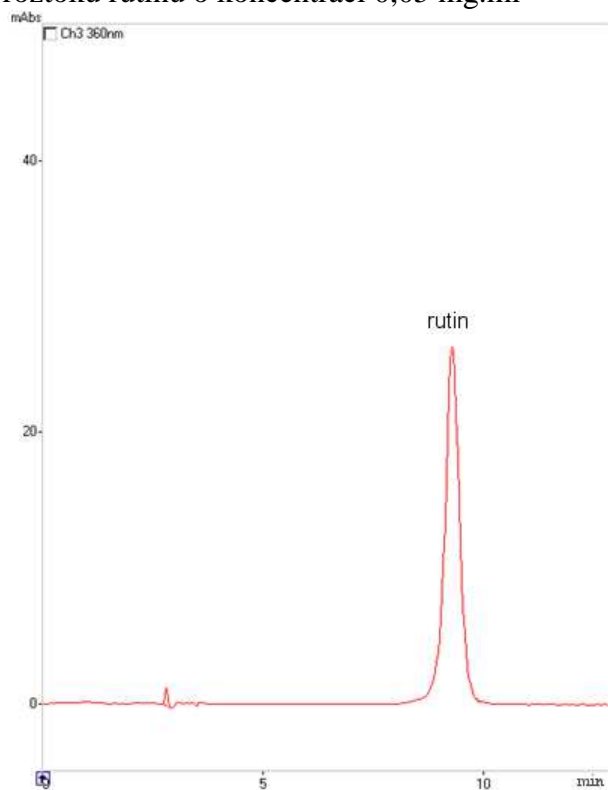
Příloha 6: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$



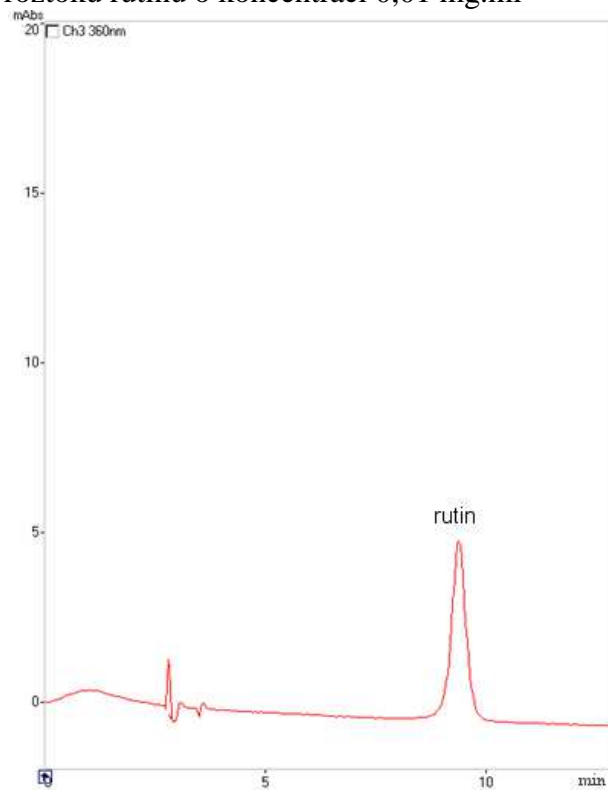
Příloha 8: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci  $0,08 \text{ mg.ml}^{-1}$



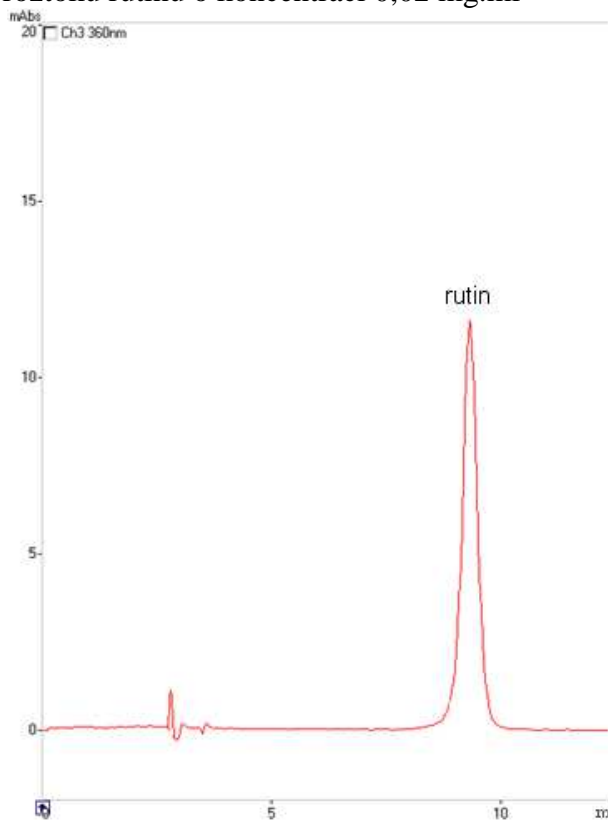
Příloha 9: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci 0,05 mg.ml<sup>-1</sup>



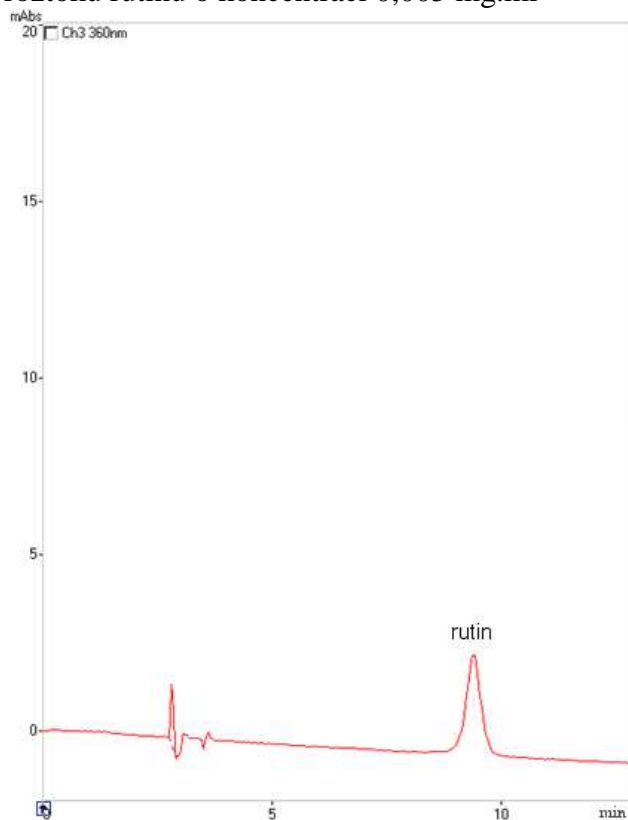
Příloha 11: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci 0,01 mg.ml<sup>-1</sup>



Příloha 10: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci 0,02 mg.ml<sup>-1</sup>



Příloha 12: Chromatogram kalibračního roztoku rutinu o koncentraci 0,005 mg.ml<sup>-1</sup>

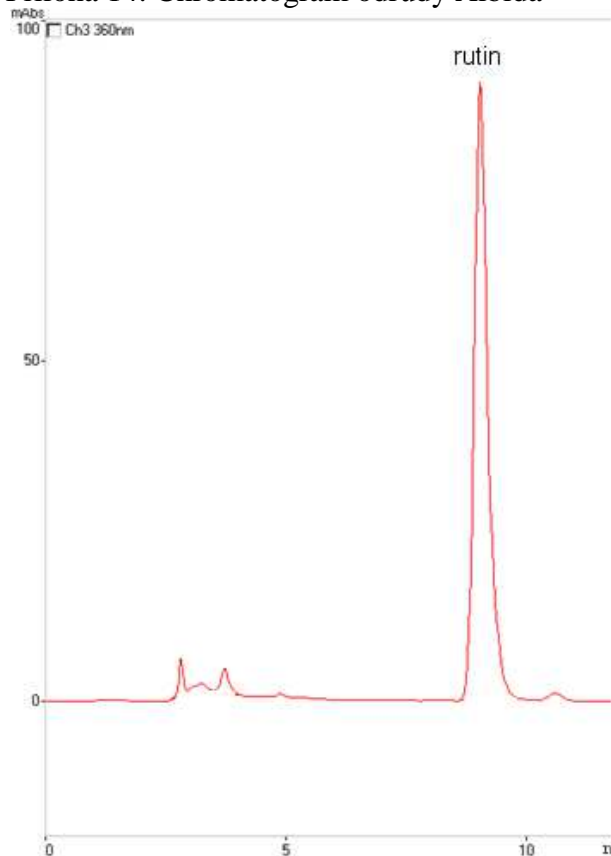




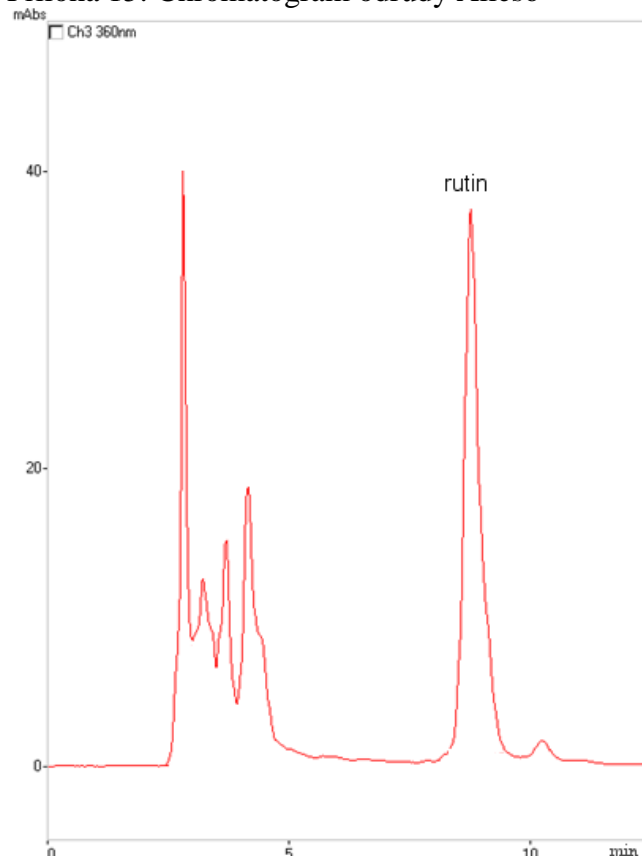
Příloha 13: Tabulka průměrných hodnot (n = 3) retenčních časů, ploch a výšek píků u kvantifikace rutinu ve vzorcích bezu černého

odrůda	retenční čas (min)	plocha píku (μV.s)	výška píku (μV)
Albida	9,01	1795254	91939
Allesö	8,76	838716	36651
Aurea	9,43	289430	12265
Bohatka	9,34	419264	14466
Dana	9,19	754592	29422
Haschberg	9,47	1718613	87629
Körsör	8,83	916062	34819
Heidegg 13	8,87	582564	23721
Planý bez	9,44	963301	40787
Mammut	9,12	639944	28031
Pregarten	9,43	1513724	63700
RieseausVoßloch	9,28	963663	35494
Sambo	8,73	1471628	57829
Sambu	8,96	1715196	67573
Samdal	8,77	1058387	43078
Sampo	8,85	1352075	56582
Samyl	9,32	923846	40415
Weihenstephan	9,22	1323334	64098

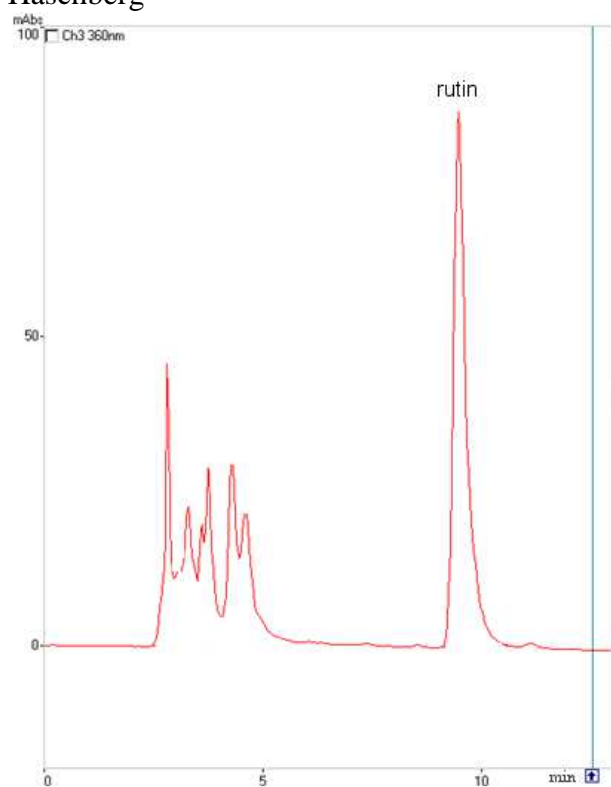
Příloha 14: Chromatogram odrůdy Albida



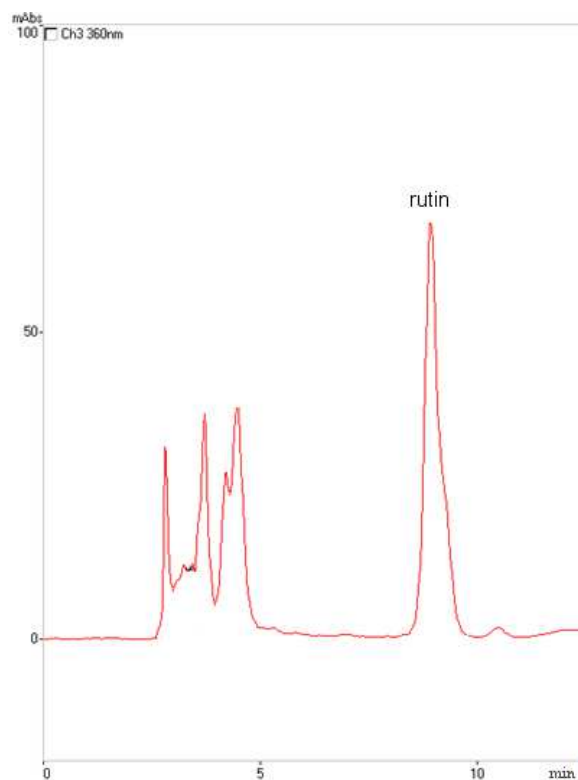
Příloha 15: Chromatogram odrůdy Allesö



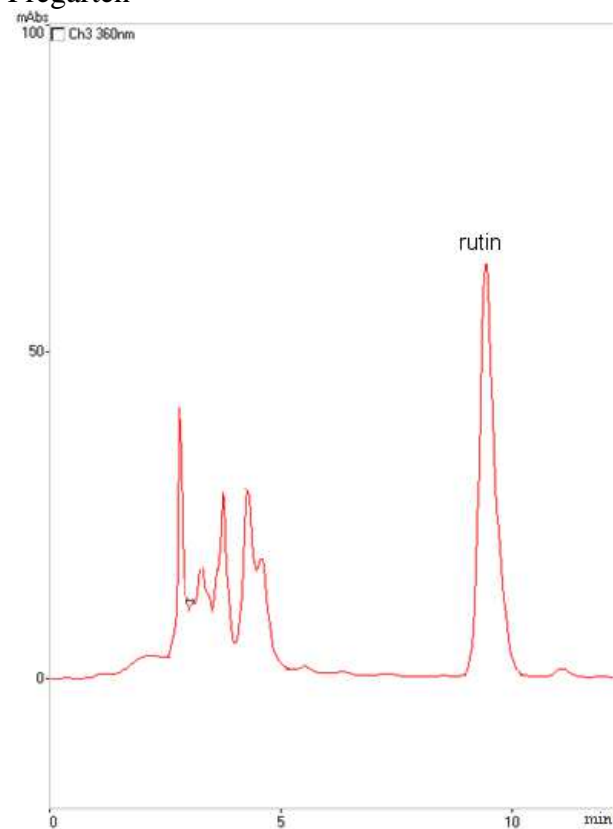
Příloha 16: Chromatogram odrůdy Haschberg



Příloha 18: Chromatogram odrůdy Sambu



Příloha 17: Chromatogram odrůdy Pregarten



Příloha 19: Chromatogram odrůdy Weihestephan

